






## Diseño de un plásmido capaz de expresar la $\beta$ -fructosidasa (invertasa) en una biofábrica de origen bacteriano

Regina Basulto-Moctezuma<sup>1</sup> , Jorayma Reyes-Mendez<sup>1</sup> , Daniela Villegas-Moncayo<sup>1</sup> , Alma Cuellar-Sánchez<sup>1</sup> , Irma Cruz-Solís<sup>1</sup> , Carlos Eduardo Gómez-Sánchez<sup>1</sup>, América Rivera-Urbalejo<sup>2</sup> , Laura Abisaí Pazos-Rojas<sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup>Tecnológico de Monterrey, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Atlixcáyotl 5718, Reserva Territorial Atlixcáyotl, 72453 Puebla, México. <sup>2</sup>Facultad de Estomatología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Calle 31 Poniente #1304, Col. Los Volcanes, Puebla, México.

\*Email autor corresponsal: [laura.pazos@tec.mx](mailto:laura.pazos@tec.mx); [laura.pazos@isu.edu.mx](mailto:laura.pazos@isu.edu.mx)

**Recibido:** 23 noviembre 2021. **Aceptado:** 28 marzo 2022

### RESUMEN

La tecnología del ADN recombinante ha permitido desarrollar la capacidad de clonar y expresar en un hospedero un gen ajeno a él, con la finalidad de aumentar la producción de proteínas recombinantes a un menor costo. En los últimos años, las aplicaciones de las enzimas tipo invertasas han sido exploradas en el sector farmacéutico, alimentario e incluso, agropecuario, debido a su capacidad de catalizar la hidrólisis de sacarosa para la síntesis de oligosacáridos. En la presente investigación se diseñó un plásmido capaz de expresar  $\beta$ -fructosidasa (BfrA) del microorganismo extremófilo *Thermotoga marítima*, proponiendo a *Escherichia coli* M15 como biofábrica para la expresión y producción de BfrA en la industria de fructooligosacáridos. El diseño del vector consideró la necesidad de una resistencia a antibióticos para las células transformadas, proponiendo el uso de cloranfenicol y ampicilina. Así como la inclusión de una cola de histidinas, que facilite la purificación de la proteína BfrA sintetizada por *E. coli* M15 mediante cromatografía de afinidad con un metal inmovilizado (IMAC). El vector seleccionado tiene un sitio de clonación múltiple para facilitar la ligación del gen *bfrA* y el gen reportero *gfp* como indicador del éxito de la ligación y la síntesis in vivo de la proteína BfrA. El plásmido propuesto ofrece la ventaja de tener una inducción controlada por lactosa pudiendo ser expresado en una bacteria de fácil y rápido crecimiento, lo que representará un menor costo en la síntesis de BfrA a nivel industrial, teniendo la oportunidad de aprovechar al máximo su uso en la producción, por ejemplo, de jarabes de azúcar con alto contenido de fructosa y fructooligosacáridos con propiedades medicinales para personas con diabetes.

**Palabras clave:** invertasa; proteína recombinante;  $\beta$ -fructosidasa; biofábrica.

## ABSTRACT

Recombinant DNA technology has allowed to clone and express a foreign gene in a host to increase the production of recombinant proteins at a lower cost. In recent years, the applications of invertase-type enzymes have been explored in the pharmaceutical, food and even agricultural sectors due to their capacity to catalyze the hydrolysis of sucrose for the synthesis of oligosaccharides. In this research, a plasmid capable of expressing  $\beta$ -fructosidase (BfrA) of the marine extremophile microorganism *Thermotoga* was designed, proposing *Escherichia coli* M15 as a biofactory for the expression and production of BfrA in the fructooligosaccharide industry. Vector design considered the need for antibiotic resistance for transformed cells, proposing the use of chloramphenicol and ampicillin. As well as the inclusion of a histidine tail, which facilitates the purification of the BfrA protein synthesized by *E. coli* M15 by affinity chromatography with an immobilized metal (IMAC). The selected vector has a multiple cloning site to facilitate the ligation of the *bfrA* gene and the *gfp* reporter gene as an indicator of successful ligation and *in vivo* synthesis of BfrA protein. The proposed plasmid offers the advantage of having a lactose-controlled induction and can be expressed in an easy and fast-growing bacterium, which will represent a lower cost in the synthesis of BfrA at an industrial level, having the opportunity to make the most of its use in the production, for example, of high fructose and fructooligosaccharide sugar syrups with medicinal properties for people with diabetes.

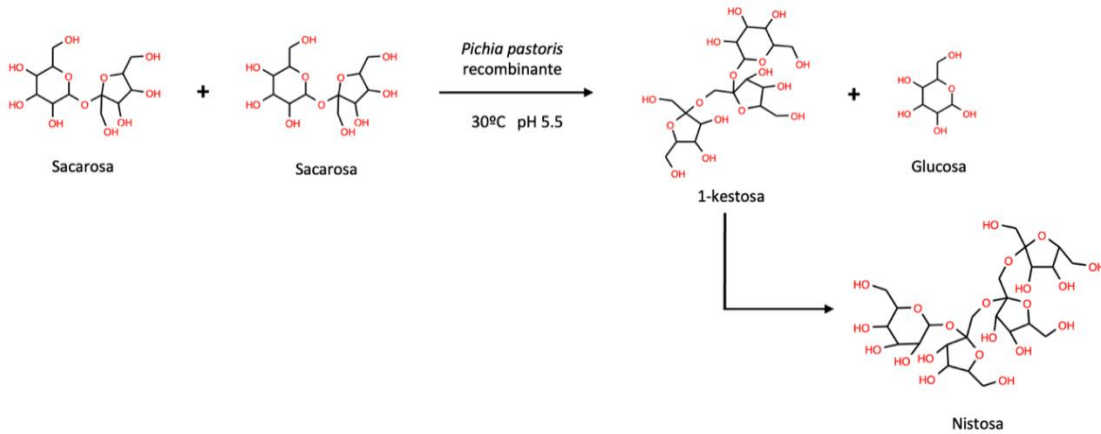
**Keywords:** invertase; recombinant protein;  $\beta$ -fructosidase; biofactory.

## INTRODUCCIÓN

La  $\beta$ -D-fructofuranosidasa, perteneciente al grupo de las invertasas, es una enzima que cataliza la hidrólisis de sacarosa (Figura 1), para producir una mezcla equimolar de glucosa y fructosa [1]. Las enzimas tipo invertasa han sido ampliamente utilizadas en la industria alimentaria, en la producción de etanol y actualmente han destacado su participación en la síntesis de compuestos prebióticos, fármacos y fructooligosacáridos [2]. Éstos últimos son de los más versátiles, dado que tienen aplicación

en el desarrollo de productos lácteos, alimentos infantiles, cereales, repostería, panadería y suplementos alimenticios [3].

Las invertasas fueron las primeras enzimas de las que se estudió su cinética, permitiendo un avance importante para ser utilizadas en la industria [2]. A nivel industrial es común obtener invertasas de cultivos de levaduras, pero también se encuentran presentes en otros microorganismos, plantas y animales. La actividad óptima de la mayoría de las invertasas ocurre en condiciones de pH ligeramente ácido,



**Figura 1.** Hidrólisis de sacarosa llevada a cabo por enzimas tipo invertasa recombinante en *Pichia pastoris*. La reacción, muestra la síntesis de fructooligosacaridos [4].

entre 4.6 y 5 y una temperatura entre 35 y 50 °C [5]. Un dato relevante en la funcionalidad de las invertasas es que cuando la hidrólisis de sacarosa se lleva a cabo a elevadas temperaturas esta reacción será más rápida, lo que conlleva a necesitar menor cantidad de enzima [1]. Sin embargo, como casi todas las enzimas, la mayoría de las invertasas, sobre todo las provenientes de levaduras, son susceptibles a factores desnaturizantes como el calor, por ejemplo, las invertasas presentes en *Saccharomyces cerevisiae* presentan una actividad óptima alrededor de los 33 °C y por encima de los 55 °C pueden desnaturizarse [6]. Existen otros microorganismos capaces de sintetizar enzimas tipo invertasas como *Aspergillus niger*, que puede crecer a una temperatura máxima entre 45-47 °C [7] o *Candida utilis*, que soporta una temperatura de hasta 40.7 °C [8], esto significa que las invertasas presentes en estos microorganismos no pueden presentar actividad fuera de estos rangos de temperatura, siendo necesaria mayor

cantidad de enzima y tiempo para realizar la hidrólisis de sacarosa. Tomando en cuenta estas consideraciones su aplicación en la industria incrementaría los costos de producción. Entre las pocas invertasas que resisten altas temperaturas, se encuentra la  $\beta$ -fructosidasa (BfrA) aislada de la arquea hipertermófila *Thermotoga maritima*, cuya temperatura óptima de crecimiento es de 80 °C [9]. Fue aislada de sedimentos marítimos localizados en Italia, siendo eventualmente de gran uso para los humanos en el área científica. Este microorganismo es capaz de soportar temperaturas extremas, por encima de los 90 °C por lo que sus enzimas son resistentes a estas condiciones [10]. Se ha descrito que la invertasa presente en *T. marítima*, es capaz de mantenerse estable en rangos de temperatura desde los 30 hasta los 75 °C [11], por lo tanto, las invertasas de microorganismos extremófilos son una excelente alternativa para aumentar la producción de fructooligosacáridos a un menor costo.

El aprovechamiento de enzimas provenientes de organismos extremófilos se puede realizar mediante la tecnología del ADN recombinante. Esta técnica ha permitido desarrollar la capacidad de clonar y expresar en un gen externo, para hacer más eficiente y accesible la producción de proteínas, favoreciendo su aplicación en la industria [12]. Los avances en ingeniería genética abren la posibilidad de producir  $\beta$ -fructosidasa de *T. maritima* en grandes cantidades utilizando un sistema de expresión procariota heterólogo, a menor costo y permitiendo su uso a nivel industrial.

En esta investigación se propone el diseño de un plásmido que permita la expresión de la enzima  $\beta$ -fructosidasa (BfrA) de *T. maritima* usando una cepa de *E. coli* como biofábrica para su producción a mayor escala, lo que permitiría su uso en la industria de fructooligosacáridos.

## METODOLOGÍA

### Selección del vector de clonación

La selección del vector de clonación que se usó en esta investigación, se realizó en la base de datos Addgene (<https://www.addgene.org>). Los parámetros que se consideraron para su selección fueron: (a) la existencia de una secuencia que agregará una cola de histidina a la proteína recombinante, esto con la finalidad de facilitar su purificación una vez que ocurra la síntesis de la invertasa [13], (b) una región promotora inducible y regulable; la presencia de un inductor favorece y aumenta la expresión de la proteína recombinante [14, 15], (c)

presencia de secuencias codificantes para una resistencia a antibiótico, lo que permite la identificación de células transformadas y (d) un sitio de clonación múltiple que permita la correcta inserción de la secuencia del gen que se quiere expresar en el vector.

### Selección de un gen reportero

En esta investigación se propone el uso de un gen reportero que permita verificar de una manera rápida que la proteína de interés se está expresando en la biofábrica propuesta, para esto se buscó en la base de datos NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), tomando en cuenta que no fuera necesario realizar una identificación molecular y que permita identificar su presencia de manera fácil y rápida sin la necesidad de una prueba de biología molecular dentro del laboratorio, siendo los genes que proporcionan luminiscencia los más ampliamente utilizados para este fin, debido a que su expresión puede verse fácilmente y su expresión puede ser relacionada directamente con la expresión *in vivo* de los genes de interés.

### Construcción *in silico* del vector que permite la expresión de la $\beta$ -fructosidasa

La herramienta utilizada para llevar a cabo la construcción *in silico* del vector que permite la expresión de la  $\beta$ -fructosidasa fue el software en línea, Benchling (<https://www.benchling.com>). Con esta herramienta se realizó la ligación *in silico* del gen que codifica la proteína BfrA. Para esto fue necesario diseñar primers específicos que

permitieron la amplificación de *bfrA*, así como un análisis de restricción que permite visualizar la correcta caracterización del plásmido. Finalmente, siguiendo la misma metodología se subclonó *gfp* como gen reportero para facilitar la identificación de los vectores recombinantes, que están expresando la proteína de interés.

### **Selección de la cepa de *E. coli* para expresar el vector recombinante, estrategias de transformación y determinación de la expresión y actividad enzimática de la $\beta$ -fructosidasa**

Se realizó una búsqueda bibliográfica en PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) en la que se tomó en cuenta la compatibilidad del vector seleccionado, con cepas de *E. coli*, disponibles comercialmente. Otro aspecto importante a considerar es que el microorganismo seleccionado cuente con un tiempo corto de generación, que sea una bacteria de fácil cultivo lo que permitirá una mayor producción de la  $\beta$ -fructosidasa. Para la propuesta de estrategia de transformación, se consideró que el método seleccionado fuera compatible con células de *E. coli*, además de considerar que la estrategia seleccionada no tuviera un costo elevado para llevarse a cabo y no se requiera un equipo especial para realizar la transformación.

A fin de determinar la expresión y actividad de la  $\beta$ -fructosidasa en la cepa elegida de *E. coli*, se seleccionó la técnica más utilizada que ayuda a verificar la expresión de proteínas recombinantes y que además provee pruebas de

funcionalidad.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

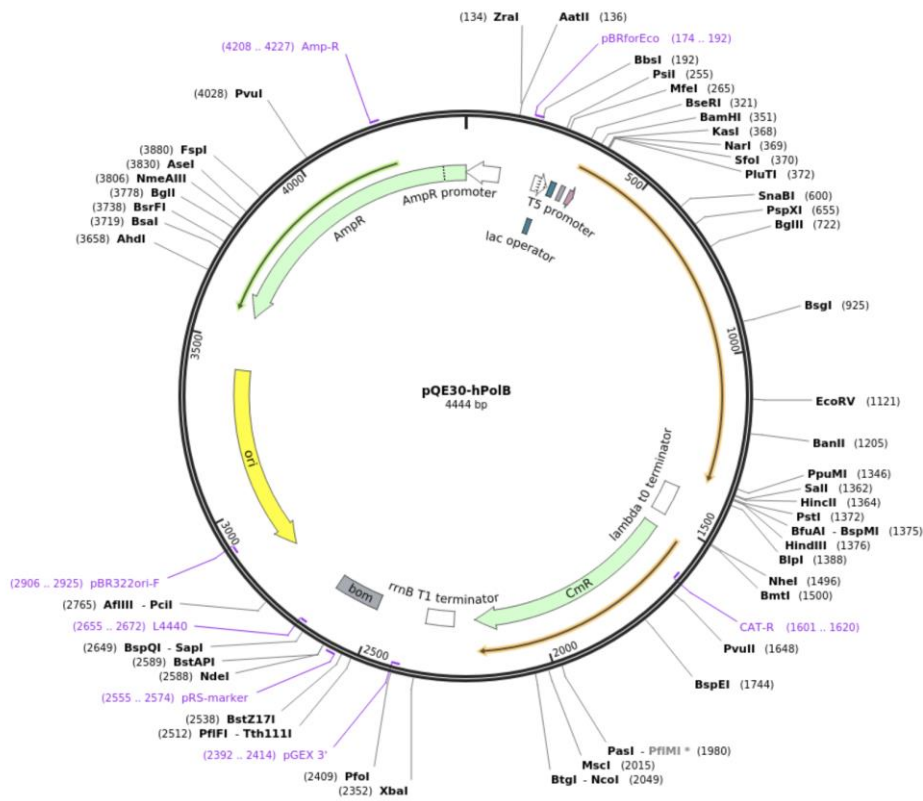
En este trabajo se propone la expresión de la invertasa  $\beta$ -fructosidasa (*BfrA*) de *T. marítima*. La secuencia completa del gen *bfrA* de *T. marítima* usada en esta investigación, se encuentra pública en la base de datos NCBI con número de acceso [AJ001073.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/AJ001073.1).

El vector de clonación seleccionado fue pQE30-hPolB, con número de ID NM\_002690 Addgene (<https://www.addgene.org/70761/>). En la Figura 2 se muestra el mapa del vector; apreciando que cuenta con una secuencia que agrega 6 tripletes de histidinas, combinando los codones CAT y CAC en la posición 333 facilitando la purificación de la  $\beta$ -fructosidasa después de su expresión. El vector cuenta con un promotor T5-*lac*, tiene dos secuencias codificantes para resistencia a cloranfenicol y ampicilina, que sirven para identificar células transformadas de las no transformadas. Cuenta con un sitio de clonación múltiple flanqueado por diferentes sitios de restricción para enzimas que permiten la inserción de la secuencia codificante de la  $\beta$ -fructosidasa.

Se eligió el vector pQE30-hPolB, debido a que cuenta con un promotor T5-*lac*, el cual es inducible por IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido), a diferencia del promotor T7, que es constitutivo [16]. El promotor T5-*lac* no requiere la coexpresión de la fago polimerasa y puede inducirse por lactosa. Este promotor es un híbrido entre el promotor del bacteriófago T5 el cual es constitutivo, más tres

operadores *lac* (*lacO*), los cuales hacen controlable la expresión usando el principio del operón lactosa [17]. Mediante la inducción por lactosa o un análogo, el sitio del operador se libera permitiendo que la expresión continúe. En este trabajo se propone usar lactosa como inductor ya que el IPTG es un azúcar sintética análoga de la lactosa. Se estima que para inducir la expresión de una proteína en un reactor usando IPTG, el costo por reactor se elevaría considerablemente [18], sin embargo, usando lactosa se tiene la misma eficiencia que la inducción por IPTG [19] y su costo es mucho

menor. En el trabajo de Menzella [14] se obtuvieron niveles similares de producción de proteína recombinante usando lactosa o IPTG como inductor; al colocar cultivos discontinuos de cepas de *E. coli* con vectores de expresión que contienen el gen de la proquimosina de ternera (*pccB*), que codifica el componente carboxiltransferasa de una carboxilasa propionil-CoA de *Streptomyces coelicolor*. Otra de las desventajas del uso de IPTG en la industria son los bajos rendimientos volumétricos, dificultades en el control del proceso y su toxicidad [20].



**Figura 2.** Características del vector pQE30-hPolB ID 70757–70761 Addgene (<https://www.addgene.org/70761/>).

El plásmido seleccionado tiene un sitio de clonación múltiple, el cual permite insertar el gen de interés; contiene dos genes de resistencia a antibiótico, ampicilina (amp) y cloranfenicol (Cm), teniendo la opción de usar sólo uno, de acuerdo a las necesidades de cada laboratorio. En esta investigación se propone como alternativa usar ampicilina para el crecimiento de las células transformadas, ya que es un antibiótico que tiene un menor costo, sin embargo, cuando se usa ampicilina se deben realizar pruebas de la concentración mínima inhibitoria que evite o disminuya la generación de falsos positivos. Es importante destacar que contar con una doble resistencia a antibiótico facilita la selección de las células transformadas, disminuyendo el riesgo de contaminación o la obtención de falsos positivos. El vector pQE30-hPolB posee una secuencia que agrega una etiqueta de hexahistidinas (6xHis) (CAT CAC CAT CAC CAT CAC), al gen ligado. Esta etiqueta tiene ventajas únicas sobre otras debido a su pequeño tamaño, minimizando la interferencia de la etiqueta en el plegamiento de proteínas nativas y en las interacciones proteína-proteína; además de la abundancia relativamente baja de repeticiones de histidina consecutivas que ocurren naturalmente [13]. Las etiquetas 6xHis pueden interactuar con cationes metálicos inmovilizados para proporcionar la captura de proteínas y complejos de proteínas de interés lo cual permite la purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad con un metal inmovilizado (IMAC). Esta metodología de purificación permite

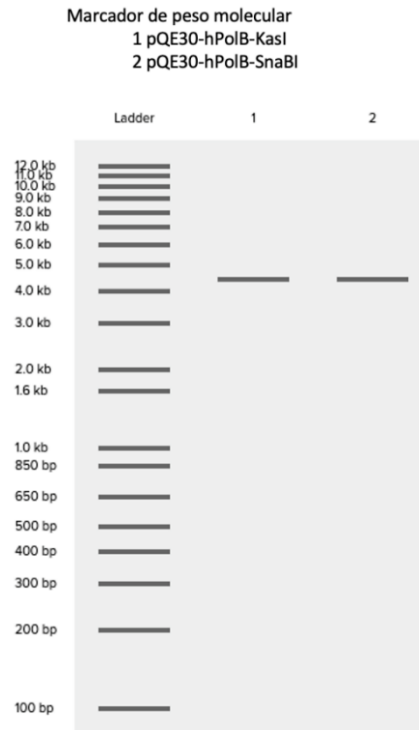
obtener una cantidad significativa de proteínas con un alto grado de pureza, de manera rápida y eficiente, donde la etiqueta de histidinas se puede escindir, dejando disponible una proteína sin marcar [22]. En comparación con otros métodos, donde se usa precipitación con sulfato de amonio la pureza de la proteína purificada depende de la temperatura, pH, manipulación y exposición al ambiente [23]. La técnica IMAC es de bajo costo pudiendo usarse tanto en condiciones nativas como desnaturizantes [24], su afinidad y especificidad relativamente altas permiten una alta eficiencia de captura.

Para llevar a cabo la construcción *in silico* del vector recombinante, primero se linearizó el vector pQE30-hPolB con las enzimas de restricción KasI, la cual al momento de realizar su corte deja extremos cohesivos y SnaBI, que realiza un corte dejando extremos romos. Para verificar que las enzimas seleccionadas tuvieran un sitio único de corte en el vector, se realizó un análisis de restricción *in silico* diseñado en el software Benchling (Figura 3). Como se puede observar, sólo se encuentra una banda que corresponde al sitio único de corte de cada una de las enzimas seleccionadas.

Para la amplificación del gen *bfrA* que codifica a la enzima  $\beta$ -fructosidasa de *T. maritima*, se diseñaron oligonucleótidos en Benchling (Tabla 1). Se verificó que el porcentaje G-C se mantuviera entre 50 y 60% y que la diferencia en la  $T_m$  (temperature melting) entre ambos no fuera mayor a 2 °C. A cada primer se le agregó la secuencia de reconocimiento de las enzimas con las que se linearizó el plásmido, KasI (forward) y SnaBI (reverse), con las que se

linearizó el plásmido tal como se muestra en la Tabla 1, de color rojo. Posteriormente, con la herramienta “Create PCR” de Benchling, se amplificó *in silico* el gen de interés, obteniendo un producto de PCR de 1317 pb que contiene la

secuencia del gen *bfrA* más los sitios de restricción. Dentro del material suplementario 1 se puede ver de manera secuencial cómo se realizó el proceso.



**Figura 3.** Análisis de restricción *in silico* del vector pQE30-hPolB, con las enzimas de restricción KasI y SnaBI. Obtenido con el software Benchling.

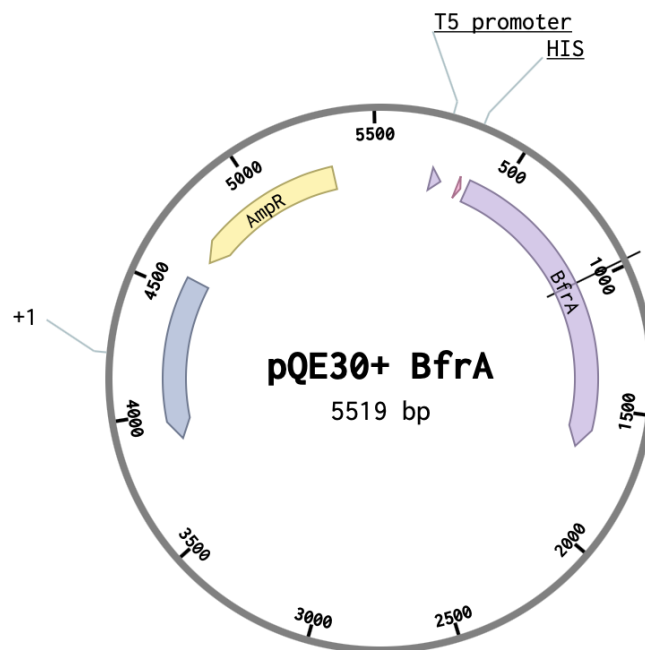
**Tabla 1.** Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen *bfrA* de *T. marítima*.

	Secuencia	Tm	Enzimas de restricción
<b>Forward</b>	ATGGCGCCATGTTCAAGCC	58.3 °C	KasI
<b>Reverse</b>	GCGCTACGTATCACAACCAT	54.9 °C	SnaBI

Para llevar a cabo la ligación *in silico* del gen *bfrA* de la  $\beta$ -fructosidasa al vector *pQE30-hPolB* se utilizó la herramienta “assembly wizard” del software Benchling. Esta herramienta permite ligar *in silico* el producto de PCR del gen *bfrA* (obtenido previamente), al sitio de clonación de *pQE30-hPolB* flanqueado por los sitios de restricción correspondientes a las enzimas *KasI* y *SnaBI*. La construcción resultante se muestra en la figura 4, observando la correcta ligación obteniendo un plásmido de 5519 pb. La inserción del gen que codifica a la  $\beta$ -fructosidasa se realizó después de la secuencia del promotor T5- lac, con la finalidad de que la transcripción del gen *bfrA* se realice en presencia del inductor, en este caso lactosa que es adicionado al medio de cultivo. Es

importante mencionar que antes de realizar el proceso de ligación *in silico* se comprobó que la secuencia del gen *bfrA* no fuera cortada por las enzimas de restricción con las que se linearizó el vector de clonación (datos no mostrados).

Para comprobar que el marco de lectura abierto no se moviera, se verificó el número de pares de bases desde el sitio de inicio del promotor hasta el sitio de inicio del gen de la  $\beta$ -fructosidasa, obteniendo 375 pb, este número resulta ser un múltiplo de tres, con lo que se tiene mayor probabilidad de la formación de codones que aseguren la síntesis correcta de la  $\beta$ -fructosidasa.



**Figura 4.** Vector recombinante “pQE30-hPolB + brfA ” obtenido con el software Benchling.

En la comprobación de vectores recombinantes, se suele hacer uso del método de diferenciación de colonias blancas y azules para identificar las células que han sido transformadas con el vector ligado de las que adquieren un vector vacío; para ello es necesario emplear reactivos como el IPTG y X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido). Con el uso de este sistema el gen de interés debe ser insertado interrumpiendo el gen *lacZ*, lo que provoca que la enzima  $\beta$ -galactosidasa no se transcriba y traduzca; las células resultantes que no ligaron el gen de interés serán capaces de presentar una tonalidad azul indicando la presencia de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, mientras que, aquellas que ligaron el gen de interés, mostrarán un color blanco [25]. En este trabajo se propone como alternativa la inserción de la secuencia genética que codifica a la proteína GFP, como gen reportero, con el propósito de que el vector diseñado facilite la identificación de clonas que contengan el vector ligado y que probablemente represente un menor costo en la etapa de selección.

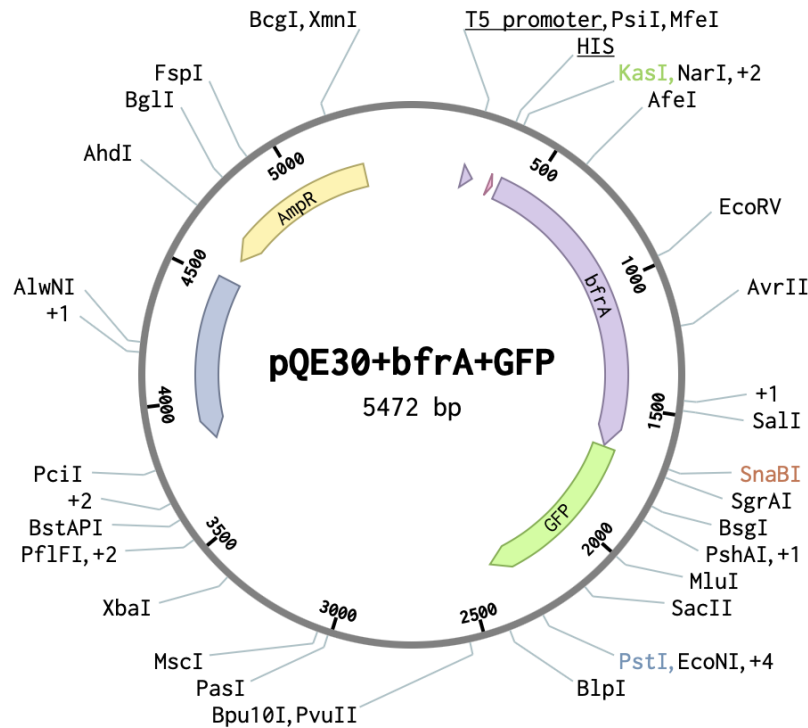
Para realizar la inserción del gen *gfp*, nuevamente se linearizó el vector pQE30-hPolB + *brfA* con las enzimas SnaBI y PstI, siguiendo la metodología descrita anteriormente. Los oligonucleótidos que se diseñaron para obtener el producto de PCR del gen *gfp* se muestran en la tabla 2, de igual manera se verificó el porcentaje de G-C y la  $T_m$ , a cada primer se le agregó la secuencia de

reconocimiento de las enzimas con las que se linearizó el plásmido, SnaBI (forward) y PstI (reverse), se muestran en rojo en la tabla 2. El tamaño del amplicón obtenido fue de 734 pb.

El gen de la proteína GFP se insertó después de la  $\beta$ -fructosidasa, debido a que al ver la expresión de la proteína GFP se puede tener una mayor certeza de que la expresión de *brfA* está ocurriendo. Las ventajas del uso de la proteína GFP son que proporciona una herramienta simple, rápida y sensible como indicador de la expresión de genes *in vivo* en células de *E. coli*. [27]. Se ha demostrado que la proteína GFP muestra una sensibilidad equivalente a la  $\beta$ -galactosidasa, sin la necesidad de preparar medios sofisticados, por ejemplo, medios que contengan X-gal [26, 27]. El vector recombinante final “pQE30-hPolB + *brfA* + GFP” que contiene la secuencia del gen *brfA* y el gen de la proteína GFP, se muestra en la figura 5. Es importante mencionar que el vector final tiene un menor tamaño (5472 pb) debido a que el sitio de corte de SnaBI y PstI no son cercanos, por lo tanto, los pares de bases existentes entre ambos sitios fueron removidos, verificando que la secuencia escindida no afecte el funcionamiento del vector ya que los pares de bases eliminados no codifican ningún gen, por lo tanto, su ausencia no afectaría el funcionamiento del vector. La secuencia completa se encuentra en material suplementario 2 resaltando las secuencias que fueron insertadas.

**Tabla 2.** Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen *gfp*

	Secuencia	Tm	Enzimas de restricción
<b>Forward</b>	GCGCTACGTAATGTCGAAGG	55.0°C	SnaBI
<b>Reverse</b>	GCCTGCAGCTACTTGTACAG	55.11°C	PstI



**Figura 5.** Vector recombinante “pQE30-hPolB + brfA + GFP”. Obtenido con el software Benchling

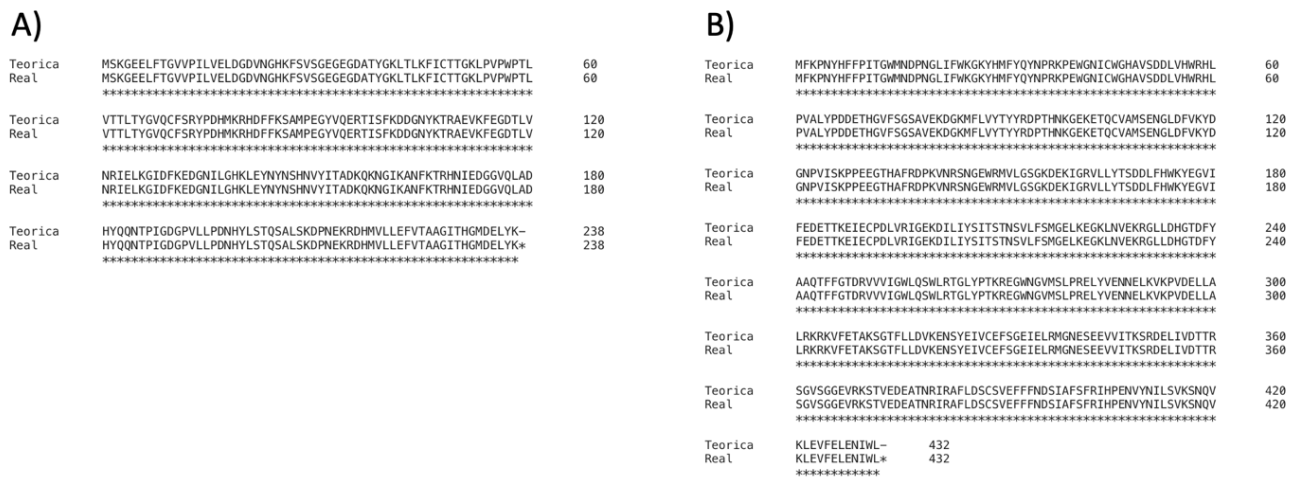
En el vector diseñado, la expresión de la proteína GFP depende de la correcta transcripción y traducción del gen *gfp*. Por ello se insertó después del gen *brfA* pero antes de la secuencia terminadora. En caso de que la ARN polimerasa utilizada no logre transcribir todo el gen, es decir, que la transcripción se vea interrumpida, la proteína no podrá expresarse, perdiendo el objetivo de su utilización. Usar una proteína fluorescente es una alternativa a lo

que comúnmente se trabaja en los laboratorios, con el uso de IPTG-X-Gal para observar colonias blancas y azules. Con esta propuesta se pretende proponer una alternativa que pueda disminuir el costo de la técnica para los laboratorios y permita la producción a mayor escala de la proteína recombinante usando como inductor un reactivo menos costoso como la lactosa. El uso de GFP en cultivos líquidos usando promotores inducibles ha sido probado

con éxito, en plásmidos que contienen el promotor *araBAD*. Se ha observado mediante microscopía, que, en células cultivadas en diferentes concentraciones de arabinosa, existe la presencia de mezclas de células oscuras y fluorescentes brillantes, lo que sugiere que los niveles de arabinosa pueden determinar el nivel de expresión del gen de interés [28]. Tomando en consideración la evidencia sobre el uso de *gfp* como reportero, en esta investigación se propone como una alternativa que permita de manera rápida y económica verificar la expresión de *brfA* y que, además, su expresión puede usarse para conocer la concentración del inductor lactosa que sería más adecuada para obtener el máximo rendimiento de la proteína BfrA en las células donde será clonado el vector pQE30-hPolB+*brfA*+GFP.

Una vez realizada la construcción *in silico* del vector pQE30-hPolB+*brfA*+GFP, se comprobó que cada una de las secuencias ligadas en el vector codificaran para las proteínas deseadas

(BfrA y GFP). Para esto, se realizó un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de ambas proteínas en el software Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), comparando las secuencias públicas disponibles en la base de datos NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), con las secuencias que se ligaron en el vector. En la figura 6, se puede observar la secuencia correspondiente a la proteína BfrA y la secuencia codificante de la proteína GFP que se usaron en este trabajo. Con este alineamiento se observó que existe un cien por ciento de identidad con las secuencias públicas disponibles en la base de datos NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Estos análisis permiten tener mayor confiabilidad de que el vector propuesto en esta investigación podrá tener una mayor probabilidad de éxito en ensayos *in vitro*.



**Figura 6.** Alineamientos realizados en Clustal Omega. A) proteína GFP y B) proteína BfrA. Ambas imágenes muestran la secuencia teórica y la expresada en el vector pQE30-hPolB + *brfA* + GFP



Las cepas de *E. coli* son una alternativa que permiten una rápida y más económica producción de proteínas recombinantes. Es uno de los microorganismos más ampliamente usados en los laboratorios de investigación y uno de los más importantes a escala industrial, debido al vasto conocimiento que se tiene de su fisiología y genética, lo cual facilita trabajos de clonación y cultivo [29, 30, 31]. Su alta velocidad de crecimiento y rendimiento celular en medios de cultivo poco costosos, aunado a la capacidad de expresar elevados niveles de proteínas heterólogas (hasta 30% del contenido proteico total), hacen de esta enterobacteria una auténtica biofábrica [32].

En esta investigación se realizó una búsqueda bibliográfica para proponer una cepa de *E. coli* que pueda funcionar como biofábrica de la enzima  $\beta$ -fructosidasa. La cepa *E. coli* M15 (QIAexpress, QIAGEN) fue propuesta para clonar el vector recombinante “pQE30-hPolB + *bfrA* + GFP”. Esta cepa de *E. coli* puede permitir una adecuada expresión del vector debido a que sintetiza la polimerasa del fago T5 que reconoce la secuencia del promotor T5 el cual se encuentra dentro del vector propuesto. Con la expresión del vector dentro de esta cepa se asegura un mayor éxito para la transcripción y síntesis de BfrA recombinante. A pesar de que existen otras cepas de *E. coli*, una de las ventajas de la cepa M15, es que permite la expresión de vectores pQE [33]. Esta cepa expresa constitutivamente la proteína represora LacI codificada por el gen *lacI*, la cual junto con el operador *lac* regulan la expresión de la proteína recombinante [34]. Si se compara con

*E. coli* cepa BL21(DE3), la cual ha sido diseñada y propuesta para clonar vectores pET y pRSET el vector aquí propuesto puede tener una expresión deficiente en esta cepa, debido a que codifica la RNA polimerasa que reconoce al promotor T7 proveniente del fago T7 [35]. Con esta propuesta se pretende presentar una biofábrica que pueda tener mayor probabilidad de éxito para su uso en laboratorios de investigación o para la producción a escala de la invertasa propuesta. Tal y como se muestra en la tabla 3, donde *E. coli* ya ha sido probada como una biofábrica de la  $\beta$ -fructosidasa, obteniendo mejores resultados de rendimiento respecto a la expresión en *L. lactis*, además tiene un menor tiempo de generación si se compara con *P. pastoris* que requiere 4 días para realizar la fermentación de la sacarosa. Estos resultados favorecen su aplicación a nivel laboratorio que podrían ser escalables a la producción industrial.

Es importante considerar que no todas las cepas de una especie bacteriana ocupan las mismas secuencias de codones para sintetizar un determinado aminoácido. Por esta razón, se realizó un análisis del uso preferencial de codones para *E. coli* que permita estimar la probabilidad de éxito de la síntesis de la  $\beta$ -fructosidasa. Usando la herramienta CAIcal SERVER (<http://genomes.urv.es/CAIcal/>) se determinó el índice CAI (índice de adaptación de codones) el cuál es un indicador de la eficiencia de la traducción de genes que se expresan de manera heteróloga ayudando a obtener la máxima producción de proteínas [36, 37]. Al realizar el cálculo del índice CAI de la

**Tabla 3.** Expresión de  $\beta$ -fructosidasa recombinante obtenida de *T. maritima* en diferentes microorganismos.

Organismo	Vector	Promotor	Resistencia	Ventajas	Desventajas	Referencia
<i>Escherichia coli</i>	pUN121	Tac (PTac): combinación de los promotores del operon lactosa y triptófano Inductor: isopropil $\beta$ -thiogalactosido (1mM)	Ampicilina y tetraciclina	Demuestra actividad de invertasa e insulinas sin perder termoestabilidad Rendimiento obtenido 14.1 mg/L, con una actividad enzimática de 603 U/mg.	La síntesis de BfrA requiere de un inductor de alto costo	[38, 39]
<i>Lactococcus lactis</i>	pNZ8148	<i>nisA</i> : antimicrobiano producido por <i>L.lactis</i> Inductor: Nisina	Cloranfenicol	La invertasa expresada en <i>L. lactis</i> tiene mayor grado de pureza y mayor actividad enzimática respecto a la invertasa expresada en <i>E. coli</i> . Rendimiento obtenido 6.3 mg/L	La síntesis de BfrA requiere nisina, antimicrobiano sintetizado por <i>L. lactis</i> El vector está diseñado para la expresión de genes en <i>L. lactis</i> Tasa de crecimiento de <i>L. lactis</i> es más lenta en comparación con <i>E. coli</i>	[40]
<i>Pichia pastoris</i>	pGAPbfrA (1x)zeo pGAPbfrA (2x)his	GAP: de Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa No requiere inductor	Zeocina y ampicilina	No provoca toxicidad celular, es altamente termoestable, innova con el uso de una levadura como huésped y demuestra facilidad de clonación Rendimiento obtenido 136 U/ml en sobrenadante de cultivo y 264 U/g de biomasa	El tiempo total de fermentación es de 4 días, tasa de generación más lenta, respecto a <i>E. coli</i>	[41]
<i>E. coli</i> M15	pQE30-hPolB + <i>bfrA</i> + GFP	T5 Inductor: lactosa	Ampicilina Cloranfenicol	Inductor de bajo costo, presencia de un gen reportero, como indicador de la expresión de genes <i>in vivo</i> . Células de <i>E. coli</i> tienen un rápido crecimiento Etiqueta 6xHis que facilita la purificación de la proteína BfrA	El vector no ha sido probado de manera experimental	Este trabajo

secuencia del gen *bfrA* usando como hospedero a *E. coli* se obtuvo un valor de 0.764. Los valores del índice CAI oscilan entre 0.0 y 1.0, en donde los valores más cercanos a 1 indican que hay un uso relativo de codones sinónimos por parte del organismo receptor [36]. Con el resultado obtenido se puede estimar que existe una mayor probabilidad de que la síntesis de la  $\beta$ -fructosidasa sea exitosa usando *E. coli* como

biofábrica. Es relevante mencionar que la proteína BfrA ya ha sido clonada en el vector pJFTINV1 y se ha expresado en células de *E. coli* (Tabla 3), obteniendo una enzima con actividad invertasa termoestable [38]. Esta investigación fue el trabajo pionero en clonar la  $\beta$ -fructosidasa de *T. marítima* en un fondo genético distinto. En otra investigación usando el vector pNZ8148 se obtuvo con éxito la

expresión de BfrA de *T. maritima* en células de *Lactococcus lactis*, proponiendo a esta especie como un huésped adecuado en la producción de invertasa para uso en la industria de alimentos y aplicaciones biotecnológicas [39]. En el caso de estudios sobre células eucariotas, se demostró la expresión de la  $\beta$ - fructosidasa de *T. maritima* en el vector pGAPbfrA(2 $\times$ )his en *Picchia pastoris*, con un proceso de fermentación de bajo costo usando azúcar de caña como fuente carbono; sin embargo se debe resaltar que para este trabajo se usó un codón optimizado que permitiera la correcta expresión de *bfrA* [40]. En la tabla 3 se resumen las principales características de las investigaciones mencionadas en donde se ha clonado con éxito la proteína BfrA de *T. marítima*, resaltando las ventajas y desventajas que cada uno de los estudios, incluyendo las características del vector diseñado en esta investigación. Los resultados obtenidos por otros grupos de investigación demuestran que BfrA puede ser sintetizada en un organismo ajeno, lo que aumenta las probabilidades de éxito del vector propuesto en este trabajo.

Tomando en consideración la información presentada en la tabla 3, en esta investigación se propone que el vector pQE30-hPolB + *bfrA* + GFP tiene ciertas ventajas respecto a las propuestas ya realizadas por otros grupos de investigación, el vector fue diseñado para usar lactosa como inductor, la cual como se mencionó anteriormente es un disacárido de bajo costo con resultados similares a la inducción por IPTG lo que disminuye de manera sustancial los costos de producción.

Tiene un gen reportero que permitirá verificar de manera rápida y a bajo costo la síntesis *in vivo* de la proteína BfrA, además la expresión de GFP puede usarse para determinar la concentración de lactosa más adecuada para obtener el máximo rendimiento de BfrA. Posee una etiqueta de histidinas que facilita la purificación de la proteína usando la técnica IMAC, que cuenta con una elevada afinidad y especificidad que permiten una mayor eficiencia de captura de la proteína de interés. Este vector puede ser clonado en células de *E. coli* las cuales poseen un corto tiempo de generación, en comparación con células de *L. lactis* y *P. pastoris*. Es importante considerar que mientras más rápido crezca un microorganismo, se obtendrá mayor rendimiento de la proteína recombinante en un menor tiempo. El rendimiento obtenido en *L. lactis* fue de 6.3 mg/L respecto a los 14.1 mg/L obtenidos en *E. coli*, en el caso de *P. pastoris* se obtuvo una actividad enzimática de 136 U/mL en sobrenadante de cultivo y 264 U/g de biomasa, sin embargo, el tiempo para obtener este resultado fue de 4 días lo que indudablemente incrementará los costos de producción ya que los requerimientos nutricionales para hacer crecer al microorganismo serán mucho mayores respecto a expresar la invertasa (BfrA) recombinante en *E. coli*.

Respecto a la obtención de invertasas de otros microorganismos, se ha realizado su síntesis con éxito en hospederos como *P. pastoris* expresando invertasa de *Aspergillus niger* [42] y *E. coli* expresando la invertasa de *Zymomonas*

*mobilis* [43]. Estos trabajos han mostrado resultados alentadores para su uso en la producción de jarabes de fructosa y fructooligosacáridos (FOS) (Tabla 4). Los FOS son ingredientes prometedores para alimentos funcionales ya que actúan como prebióticos y ejercen un efecto benéfico en la salud humana, participando en la prevención de enfermedades cardiovasculares, cáncer de colon y osteoporosis [44].

El éxito en la síntesis de proteínas recombinantes, depende en gran medida de la correcta transformación de las células que se encargarán de producirla. En este trabajo se propone realizar este proceso mediante la generación de células quimio-competentes de *E. coli* M15 usando  $\text{Ca}_2\text{Cl}$  y choque térmico. Esta metodología facilita la adsorción del ADN sobre la superficie celular y el choque térmico permite la entrada del ADN adsorbido al citoplasma de la célula [45]. Otro método de transformación bacteriana ampliamente usado en los laboratorios es la electroporación, sin embargo, requiere un equipo especial lo que eleva el costo, además, existen factores que pueden determinar su eficiencia como: la duración del pulso eléctrico, temperatura y concentración haciéndolo un proceso más complejo de realizar [46].

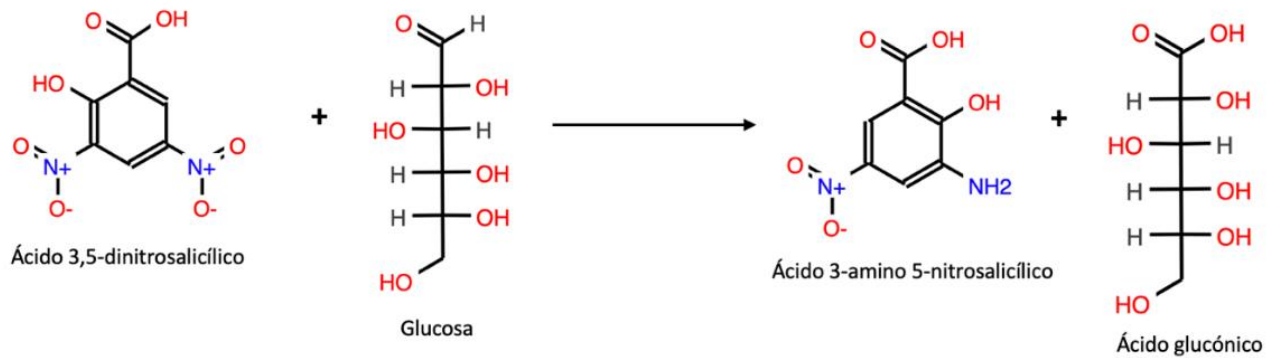
La generación de células competentes usando compuestos químicos, tiene un menor costo y no requiere un equipo especial para poder realizarse. Existe evidencia en donde se ha comprobado que células electro competentes tienen índices de fallo consecutivos [47]. Dada la sensibilidad que presentan las células electro

competentes, es posible perder cantidades sumamente valiosas de la muestra en caso de que entren en contacto con materiales ricos en sal o en sodio, además de tener una producción altamente costosa en comparación con las células químico competentes.

Un aspecto importante que se debe considerar en la producción de proteínas recombinantes, es comprobar su funcionalidad. En esta investigación se propone el uso del DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), para comprobar que la  $\beta$ -fructosidasa sintetizada en células transformadas de *E. coli* M15 tiene actividad enzimática [48]. Este método colorimétrico, permite determinar la concentración de azúcares reductores presentes en una muestra. Mediante el análisis cuantitativo de los productos obtenidos de la reacción estequiométrica REDOX, que ocurre entre el DNS y el azúcar reductor (Figura 7). Es decir, el ácido 3,5 dinitrosalicílico oxida los azúcares y también provoca su propia reducción endotérmica cambiando a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico. El DNS presenta un color amarillo mientras que el producto de la reacción provoca un viraje entre café y rojo. Para completar el protocolo del método, se requiere realizar una curva de calibración y posteriormente analizar la muestra de interés. Dicho análisis involucra realizar una lectura de absorbancia en el espectrofotómetro en la zona de 540-570 nm de absorbancia y la elaboración de los cálculos para determinar la concentración de ácido 3-amino-5-nitrosalicílico. Esta concentración es relativamente proporcional a la concentración de azúcares reductores [49].

**Tabla 4.** Ejemplos de proteínas recombinantes clonadas con éxito y su aplicación o posible aplicación en la industria.

Vector de expresión	Proteína clonada	Importancia	Expresión heterologa	Uso y aplicaciones	Referencias
pUC57	Invertasa de <i>Aspergillus niger</i>	Enzimas que hidrolizan el enlace o-glicosídico de la sacarosa para producir glucosa y fructosa.	<i>Pichia pastoris</i> obteniendo una producción de inversasa extracelular y periplásmica de 1018 U/L de medio de cultivo, a pH 5 y 60°C de temperatura.	Industria alimentaria para producción de jarabes de fructosa, producción de oligosacáridos como ingredientes para alimentos funcionales actuando como prebióticos, participando en la prevención de enfermedades cardiovasculares, cáncer de colon y osteoporosis	[42]
pET30Ek/LIC	Invertasa de <i>Zymomonas mobilis</i>		<i>E.coli</i> BL21(DE3) usando como inductor IPTG. Se obtuvo un rendimiento de 2.7 g/L de invertasa extracelular		[43]
pHIL-D2	Lacasa de <i>Trametes versicolor (lcc1)</i>	Fenol oxidasas que contienen cobre, su propiedad de oxidar sustratos complejos orgánicos e inorgánicos le confieren un potencial importante en procesos de biorremediación.	<i>Pichia pastoris</i> . obteniendo una actividad enzimática de 11.5 U/mL de medio.	Deslignificación y bioblanqueamiento de pulpas o fibras, importantes para la industria del papel y textil. Alternativa para el tratamiento de aguas residuales.	[55]
pMTTEVA - m/pSRAFP	Proteína anticongelante (AFP) tipo II de <i>Hemipterus americanus</i>	Capacidad de disminuir la temperatura de, congelación sin afectar la temperatura de fusión (Tm), pueden modificar la morfología de los cristales de hielo, inhibir el crecimiento de cristales de hielo (recristalización), mejorar la integridad celular y reducir el crecimiento microbiano	<i>Drosophila</i> S2 obteniendo un rendimiento de 95 mg/L de AFP tipo II completamente activa	Industria de alimentos que involucran almacenamiento en congelación, siendo alternativa como conservantes, para alimentos congelados y refrigerados	[59]
pET14b-BLAlphaC	$\alpha$ -Amilasa temoestable de <i>Bacillus licheniformis</i>	Cataliza la hidrólisis de los enlaces glucosídicos $\alpha$ -1,4 de polisacáridos como almidón y glucógeno	<i>E. coli</i> BL21(DE3) mostrando una $\alpha$ -Amilasa con integridad estructural y altamente activa y estable a 85°C y pH 8 Se obtuvo una actividad máxima de 313.2 U/L con una concentración de 5mg/ml de almidón	Degradación de almidón en la industria alimentaria, fabricación de jarabes de fructosa y glucosa; mejorar la harina en la industria de la panificación; producción de almidones modificados para la industria papelera, eliminar almidón en la fabricación de textiles, aditivo de detergentes para lavadoras.	[60]
pET-hGH1	Hormona de crecimiento humano (hGH) cDNA	Proteohormona secretada por la glándula pituitaria. Actúa por su unión al receptor hGH, induciendo la producción de (IGF-I), promueve el crecimiento longitudinal en niños y adolescentes, en adultos cumple funciones metabólicas importantes	<i>E. coli</i> BL21 (DE3), obteniendo un rendimiento de entre 269.94mg/L de medio y 294.18mg/L de hormona hGH	Administración de hormona de crecimiento humana recombinante (rhGH) producida por procariotas, como tratamiento de rutina para niños y adultos con deficiencia en su producción	[61]



**Figura 7.** Reacción de oxidación de azúcares reductores, método DNS [50]

El hecho de que se detecten azúcares reductores, indica que BfrA está hidrolizando la sacarosa. Con el método DNS, también se pueden determinar los niveles equivalentes de glucosa formados en el medio de reacción de la invertasa y, a partir de ellos, la actividad enzimática. Una de sus principales ventajas de la metodología de DNS sobre otros procedimientos, es su alta sensibilidad y productividad al ser un método espectrofotométrico [51, 52].

Para determinar la cantidad de  $\beta$ -fructosidasa que las células de *E. coli* M15 están sintetizando se puede usar la metodología SDS-PAGE, la cual emplea geles de poliacrilamida y un detergente aniónico (dodecilsulfato sódico). Esta metodología es de las más usadas para determinar la presencia de una proteína específica ya que provee gran resolución, un amplio rango de temperatura, pH y fuerza iónica [53]. Con esta técnica, SDS-PAGE, las proteínas se desnaturalizan completamente y posteriormente se separan debido a sus diferentes pesos moleculares, entre menor peso, más rápidamente migrarán dentro del gel de acrilamida. Apoyada por densitometría, SDS-

PAGE lleva un control de las proteínas de interés, teniendo como referencia una cantidad conocida de la misma en  $\text{mg mL}^{-1}$ , lo que permite obtener un resultado numérico al final del análisis [54].

La importancia de la producción de proteínas recombinantes radica en ser una alternativa rápida, económica y eficaz para obtener proteínas puras y biológicamente activas para utilizarlas en investigación, medicina o uso industrial. Uno de los aspectos importantes para el desarrollo de estas es la selección del sistema de expresión apropiado y características del hospedero que permitan una adecuada producción para su futura aplicación. En el mundo existen diversos grupos de investigación que se han centrado en mejorar y desarrollar vectores y sistemas de expresión que permitan explotar al máximo la producción de proteínas recombinantes. La aplicación de las proteínas recombinantes puede ser diversa (Tabla 4), por ejemplo, las lacasas recombinantes obtenidas de *Trametes versicolor* [55] pueden tener una aplicación para el bioblanqueamiento de pulpas o fibras que se usan en la producción de papel o la industria textil [56] y el tratamiento de aguas

residuales [57]. En el caso de aplicaciones en la industria de alimentos se pueden encontrar proteínas recombinantes como AFP (antifreeze protein), la cual, en animales, como insectos y peces, confiere resistencia a la congelación a través de una disminución del punto de congelación de los fluidos extracelulares (histéresis térmica, TH) [58]. La expresión recombinante de proteínas AFP en células de *Drosophila* S2 abre la posibilidad de su aplicación como conservante para alimentos que requieren refrigeración y congelación [59]. El caso de las  $\alpha$ -Amilasas de *Bacillus licheniformis* que catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4 de polisacáridos como almidón y glucógeno, ofrecen una alternativa para la degradación de almidón en la industria alimentaria, fabricación de jarabes de fructosa y glucosa. Además, pueden aprovecharse en producción de almidones modificados en la producción de papel, para eliminar almidón en la fabricación de textiles y cómo aditivo en detergentes para lavadoras [60].

A pesar del desarrollo de diversos sistemas de expresión y el avance en las técnicas de expresión y purificación de proteínas recombinantes, en repetidas ocasiones resulta importante la aplicación de estrategias de optimización de la expresión recombinante, con el objetivo de garantizar un adecuado rendimiento y estabilidad de las propiedades biológicas de la proteína que se va expresar. El uso de cepas hospederas adecuadas y el diseño óptimo de los vectores de expresión son parte fundamental para alcanzar el rendimiento y

calidad esperada. Tomando en consideración estos aspectos esta investigación se centró en el diseño de un vector que pueda expresar una invertasa de un organismo extremófilo, usando un inductor de bajo costo, con una etiqueta de histidinas que facilite su purificación y que su expresión pueda llevarse a cabo en un hospedero de fácil cultivo como *E. coli*. El vector pQE30-hPolB+brfA+GFP ofrece una alternativa para su explotación en la industria, donde se puede aprovechar su producción a gran escala. Resaltando que el diseño de un vector adecuado es un paso imprescindible que a futuro permita el escalado del cultivo a grandes volúmenes.

## CONCLUSIÓN

Los avances en el desarrollo de diversas herramientas en línea como el software Benchling permiten el diseño *in silico* de vectores que pueden tener una aplicación biotecnológica, este tipo de herramientas brindan un apoyo, dado que proveen un punto de referencia confiable, son buenas opciones para agilizar el proceso de experimentación y de esta forma ahorrar recursos, por lo que el uso de softwares son un soporte para el trabajo del laboratorio. De acuerdo a los análisis a detalle que se realizaron para el diseño del plásmido propuesto y la evidencia que existe en el éxito de la expresión de la  $\beta$ -fructosidasa recombinante, el vector pQE30-hPolB+brfA+GFP diseñado en este trabajo cuenta con distintas características que lo hacen un buen candidato para la producción de la proteína

BfrA de *T. maritima* en células de *E. coli* M15, esperando una producción eficiente y de bajo costo. Dentro de las principales características del vector destacan la presencia del promotor T5 *lac* inducible por lactosa, el etiquetado de seis histidinas que faciliten la purificación de la proteína BfrA, la expresión de un gen reportero como indicador de la expresión de genes *in vivo* en células de *E. coli* y la presencia de genes de resistencia que ayudan a la identificación de las clonas positivas. Para corroborar la funcionalidad de la  $\beta$ -fructosidasa clonada se propone el método colorimétrico DNS que permite determinar la concentración de azúcares reductores oxidados. Es importante destacar que el vector pQE30-hPolB+brfA+GFP propuesto en este trabajo debe ser probado en condiciones de laboratorio realizando las digestiones, ligaciones y clonación necesaria, para asegurar el éxito del diseño propuesto. Lograr la síntesis de la  $\beta$ -fructosidasa en *E. coli* M15 puede ser una alternativa para sintetizar a gran escala esta enzima y tener un uso en la industria alimentaria y farmacéutica; siendo algunas de sus aplicaciones más relevantes, la producción de alimentos infantiles, alimentos animales, panadería, probióticos y prebióticos en fármacos. Además, se ha demostrado que la aplicación de fructooligosacáridos en dichas industrias, representa un beneficio al tracto intestinal de los consumidores por lo que el fomento de su desarrollo y aplicación equivale a apostar por mejor calidad de alimentos y fármacos en el futuro.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la empresa ZERO WASTE las facilidades y asesoría proporcionada para la realización de esta investigación.

## REFERENCIAS

- [1]. Zamora-Leitón MM., Molina-Cordoba M., Chacón-Valle G. Evaluación del efecto de la temperatura, concentración y flujo volumétrico en la hidrólisis de sacarosa mediante una invertasa inmovilizada en un reactor esférico. *Ingeniería* 2010; 21(1): 61-74.
- [2]. Sainz-Polo MA., Ramírez-Escudero M., Lafraya A., Marín-Navarro J., Polaina J, Sanz-Aparicio J. Three-dimensional Structure of Saccharomyces Invertase. *Journal of Biological Chemistry* 2013; 288 (4): 9755-9766.
- [3]. Escudero-Álvarez E., González-Sánchez P. La fibra dietética. *Nutrición Hospitalaria* 2006; 21(2): 61-72.
- [4]. Rodríguez-Rico I., Sobrino-Legón A., Hernández L. Escalado de la reacción de biosíntesis de fructooligosacáridos, a partir de sacarosa, en biorreactores tipo tanque agitado. *Tecnología Química* 2016; 31(2): 19-25.
- [5]. Ferreira-Vega M., Farias-Rossler A., Peraça-Toralles R., Augusto-Ruiz W., Valmor-Rombaldi C. Extracción optimizada y purificación parcial de invertasa aislada de

*Saccharomyces cerevisiae* en puré de durazno. *Revista Brasileira de Fruticultura* 2018; 40(2): 2-7.

[6]. Schülke N., Schmid FX., The stability of yeast invertase is not significantly influenced by glycosylation. *Journal of Biological Chemistry* 1988; 263(18): 8827-8831.

[7]. Palacios-Cabrera H., Taniwaki MH., Hashimoto JM., Menezes HC. Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. *Brazilian Journal of Microbiology* 2005; 36(1): 24–28.

[8]. Madeira-Lopes A. The influence of temperature on the relations between thermal death, growth and yield in *Candida utilis*. *Journal of Basic Microbiology* 1985; 25(1): 39-42.

[9]. Griffiths JS., Wymer NJ., Njolito E., Niranjanakumari S., Fierke CA., Toone EJ. Cloning, isolation and characterization of the *Thermotoga maritima* KDPG aldolase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2002; 10(3): 545–550.

[10]. Wang Z., Tong W., Wang Q., Bai X., Chen Z., Zhao J. *et al.* The Temperature Dependent Proteomic Analysis of *Thermotoga maritima*. *PLoS ONE* 2012; 7(10): 1-9.

[11]. Huber R., Langworthy TA., König H., Thomm M., Woese CR., Sleytr UB., *et al.* *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90 °C. *Archives of Microbiology* 1986; 144: 324–333.

[12]. Gnoth S., Jenzsch M., Simutis R. Lübbert A. Control of cultivation processes for recombinant protein production: a review. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 2008; 31(1): 21–39.

[13]. Puckett MC. Hexahistidine (6xHis) Fusion-Based Assays for Protein-Protein Interactions. In Meyerkord C, Fu H, Eds. *Methods in Molecular Biology*; 2015; 1278: 365-370.

[14]. Menzella HG., Ceccarelli EA., Gramajo HC. Novel *Escherichia coli* strain allows efficient recombinant protein production using lactose as inducer. *Biotechnology Bioengineering* 2003; 82(7): 809-817.

[15]. Chhetri G., Kalita P., Tripathi T. An efficient protocol to enhance recombinant protein expression using ethanol in *Escherichia coli*. *MethodsX* 2015; 2: 385-391.

[16]. Elroy-Stein O., Moss B. Cytoplasmic expression system based on constitutive synthesis of bacteriophage T7 RNA polymerase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87(17): 6743-7.

[17]. Ivanov I., Rommens J., Sarafova A. Maximova V., Usheva A., Bardarov S. *et al.* Chemical synthesis and characteristics of a hybrid phage T5-lac promoter. *Microbiologica* 1990; 13(2): 85-90.

[18]. Culture Biosciences. Bioreactor Lab Cost Calculator. [Go.Culturebiosciences.Com](https://go.culturebiosciences.com). Available at: <https://go.culturebiosciences.com/cost-calculator> .(Accessed on: september 20, 2021).

- [19]. Neubauer P., Hofmann K., Holst O., Mattiasson B., Kruschke P. Maximizing the expression of a recombinant gene in *Escherichia coli* by manipulation of induction time using lactose as inducer. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1992; 36: 739-744.
- [20]. Donovan RS., Robinson CW., Glick BR. Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *Journal of Industrial Microbiology* 1996; 16: 145–154.
- [21]. Gombert AK., Kilikian BV. Recombinant gene expression in *Escherichia coli* cultivation using lactose as inducer. *Journal of Biotechnology* 1998; 60: 47–54.
- [22]. Bornhorst JA., Falke JJ. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods in Enzymology* 2000; 326: 245–254.
- [23]. Goretti M., Purwanto M. The role and efficiency of ammonium sulphate precipitation in purification process of papain crude extract. *Procedia Chemistry* 2016; 18: 127-131.
- [24]. Hochuli E., Bannwarth W., Döbeli, H., Gentz R., Stüber D. Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Bio/Technology* 1998; 6: 1321–1325.
- [25]. Zhou MY., Gomez-Sanchez CE. Universal TA Cloning. *Current Issues in Molecular Biology* 2000; 2(1): 1-7.
- [26]. Lissemore JL., Jankowski JT., Thomas CB., Mascotti DP., deHaseth PL. Green fluorescent protein as a quantitative reporter of relative promoter activity in *Escherichia coli*. *Biotechniques* 2000; 28(1): 82-84, 86, 88-89.
- [27]. Zhang G., Gurtu V., Kain SR. An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 23;227(3):707-11
- [28]. Siegele DA., Hu JC. Gene expression from plasmids containing the araBAD promoter at subsaturating inducer concentrations represents mixed populations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94 (15): 8168-8172.
- [29]. Peti W., Page R. Strategies to maximize heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost. *Protein Expression and Purification* 51: 1-10.
- [30]. Rosano GL., Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology* 2014; 5: 172.
- [31]. Jia B., Jeon CO. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open Biology* 2016; 6(8): 160-196.
- [32]. González A., Fillat MF. Aspectos metodológicos de la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista de Educación 14 Bioquímica (REB)* 2018; 37(1): 14-27.
- [33]. Agüero JA., Hotzel H., Aguilar L., Lima C., Sachse K., Martínez S. Expresión in vitro en *Escherichia coli*, de un fragmento del gen *vlha.5.02* de la principal familia de hemaglutininas de *Mycoplasma gallisepticum*.

Revista de Salud Animal 2011; 33(1): 32-37.

[34]. Villarejo MR., Zabin I. Beta-galactosidase from termination and deletion mutant strains. *Journal of Bacteriology* 1974; 120(1): 466-74.

[35]. Huber R., Roth S., Rahmen N., Büchs J. Utilizing high-throughput experimentation to enhance specific productivity of an *E.coli* T7 expression system by phosphate limitation. *BMC Biotechnol* 2011; 11: 22.

[36]. Puigbò P., Bravo IG., Garcia-Vallve S. CAIcal: a combined set of tools to assess codon usage adaptation. *Biology Direct* 2008; 3:38.

[37]. Khandia R., Singhal S., Kumar U., Ansari A., Tiwari R., Dhama K., et al. Analysis of Nipah Virus Codon Usage and Adaptation to Hosts. *Frontiers in Microbiology* 2019; 10: 886.

[38]. Liebl W., Brem D., Gotschlich A. Analysis of the gene for beta-fructosidase (invertase, inulinase) of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*, and characterisation of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1998; 50(1): 55-64.

[39]. Pek HB., Klement M., Ang KS., Chung BK., Ow DS., Lee DY. Exploring codon context bias for synthetic gene design of a thermostable invertase in *Escherichia coli*. *Enz Microb Technol* 2015; 75(76):57–63.

[40]. Pek HB., Lim PY., Liu C., Lee DY., Bi X., Wong FT., et al. Cytoplasmic expression of a thermostable invertase from *Thermotoga maritima* in *Lactococcus lactis*. *Biotechnology Letters* 2017; 39(5): 759-765.

[41]. Menéndez C., Martínez D., Trujillo LE.,

Mazola Y., González E., Pérez ER., et al. Constitutive high-level expression of a codon-optimized  $\beta$ -fructosidase gene from the hyperthermophile *Thermotoga maritima* in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2013; 97(3): 1201-1212.

[42]. Veana F., Fuentes-Garibay JA., Aguilar CN., Rodríguez-Herrera R., Guerrero-Olazarán M., Viader-Salvadó JM. Gene encoding a novel invertase from a xerophilic *Aspergillus niger* strain and production of the enzyme in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology* 2014; 63: 28-33.

[43]. Vásquez-Bahena JM., Vega-Estrada J., Santiago-Hernández JA., Ortega-López, J., Flores-Cotera, LB., Montes-Horcasitas, MC., et al. Expression and improved production of the soluble extracellular invertase from *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology* 2006; 40(1), 61-66.

[44]. Linde D., Macias I., Fernandez-Arrojo L., Plou FJ., Jimenez A., Fernandez-Lobato M. Molecular and biochemical characterization of a beta-fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied and Environmental Microbiology* 2009; 75: 1065–1073.

[45]. Serrano-Rivero Y., Hernández-García A., Fando-Calzada R. Comparación de dos métodos para la preparación de células competentes en *Escherichia coli*. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 2012; 44: 2.

[46]. Taketo A. DNA transfection of *Escherichia coli* by electroporation.

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression 1988; 949(3): 318-324.

[47]. Han B., Sivaramakrishnan P., Lin CCJ., Neve IA., He J., Tay L. *et al.* Microbial Genetic Composition Tunes Host Longevity. *Cell* 2017; 169(7): 1249–1262.

[48]. Ávila-Núñez R., Rivas-Pérez B., Hernández-Motzezak R., Chirinos M. Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en *Agave cocui Trelease*. *Multiciencias* 2012; 12(2): 129-135.

[49]. Gusakov AV., Kondratyeva EG., Sinitsyn PA. Comparison of Two Methods for Assaying Reducing Sugars in the Determination of Carbohydrase Activities. *International Journal of Analytical Chemistry* 2011; 2011: 1–4.

[50]. Kulkarni RU. Conjugation of Dextran with Antibiotic Drugs and Release Studies. Master thesis, Indian Institute of Technology, Varanasi, Uttar Pradesh, India, May 2016.

[51]. Bello-Gil D., Carrera-Bocourt E., Díaz-Maqueira Y. Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar* 2006; XL(2): 45-50.

[52]. Negrulescu A., Patrulea V., Mincea MM., Ionascu C., Vlad-Oros BA., Ostafe V. Adapting the reducing sugars method with dinitrosalicylic acid to microtiter plates and microwave heating. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2012; 23(12): 2176-2182.

[53]. Schägger H. Tricine–SDS-PAGE. *Nature*

Protocols 2006; 1:16–22.

[54]. Hames BD. *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*. 3rd ed. Oxford University Press, Oxford, New York 1998.

[55]. Hong F., Meinander NQ., Jönsson LJ. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering* 2002; 79: 438-449.

[56]. Abadulla E., Tzanov T., Costa S., Robra KH., Cavaco-Paulo A., Gubitza GM. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Applied and Environmental Microbiology* 2000; 66: 3357-3362.

[57]. Bergbauer M., Eggert C., Kraepelin G. Degradation of chlorinated lignin compounds in a bleach plant effluent by the whiterot fungus *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* 1991; 35: 105-109.

[58]. Knight CA, DeVries AL, Oolman L.D. Fish antifreeze protein and the freezing and recrystallization of ice. *Nature* 1984; 308: 295–296.

[59]. Scotter AJ., Kuntz DA., Saul M., Graham LA., Davies PL., Rose DR. Expression and purification of sea raven type II antifreeze protein from *Drosophila melanogaster* S2 cells. *Protein Expression and Purification* 2006; 47(2):374-383.

[60]. Rasiah, IA., Rehm, BH. One-step production of immobilized  $\alpha$ -amylase in recombinant *Escherichia coli*. *Applied and*

Environmental Microbiology 2009; 75(7):  
2012-2016.

[61]. Ghavim M., Abnous K., Arasteh F.,  
Taghavi S., Sadat-Nabavinia M., Alibolandi  
M., *et al.* High level expression of recombinant

human growth hormone in *Escherichia coli*:  
crucial role of translation initiation region.  
Research in Pharmaceutical Sciences 2017;  
12(2): 168-175.