



# Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides that stimulate the gut microbiota

**Title in Spanish:** *Síntesis enzimática de fructooligosacáridos estimuladores de la microbiología colónica*

Paloma Santos-Moriano<sup>1\*</sup> Lucía Fernández-Arrojo<sup>1</sup> Bárbara Rodríguez-Colinas<sup>1</sup> Antonio Ballesteros<sup>1</sup> Francisco J. Plou<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Catálisis y Petroleoquímica CSIC 28049 Madrid Spain

**ABSTRACT:** The control of the intestinal flora is one of the targets of the functional foods and nutraceuticals. A symbiotic equilibrium can be achieved by the intake of live microorganisms (probiotics) or by the so-called prebiotics (non-digested oligosaccharides). Prebiotics are selectively fermented by the human microbiota allowing specific changes and conferring benefits upon host well-being and health. Among prebiotics fructooligosaccharides (FOS) constitute one of the most established groups. Levansucrases (EC 2.4.1.10) are a family of enzymes that catalyse the transfer of the fructosyl moiety from sucrose to different acceptors such as: (1) sucrose -yielding FOS that can be further fructosylated forming levan a polymer with food and biomedical applications -; (2) water resulting in sucrose hydrolysis. In this work a levansucrase from *Zymomonas mobilis* was characterized and the reaction products using sucrose as substrate were analysed by High-Performance Anion-Exchange Chromatography (HPAEC-PAD). The number of FOS synthesized by the soluble enzyme was significantly higher compared with previous reports. In order to optimize the biocatalytic process the enzyme was further immobilized by entrapment in calcium alginate gel and the resulting beads were dehydrated to obtain DALGEEs (Dry ALGinate Entrapped Enzymes). Different immobilization strategies were studied to minimize enzyme loss (lixiviation) throughout the pores. The effect of enzyme immobilization on levansucrase behaviour was also analysed.

**RESUMEN:** El control de la microflora intestinal es uno de los objetivos de los alimentos funcionales y nutracéuticos. El equilibrio simbiótico puede lograrse mediante la ingesta de microorganismos vivos (probióticos) o de los denominados prebióticos (oligosacáridos no digeribles). Los prebióticos son fermentados selectivamente por la microbiota generando cambios específicos en su composición que producen un beneficio en la salud del hospedador. Entre los prebióticos los fructooligosacáridos (FOS) constituyen uno de los grupos más importantes. Las levansacarasas (EC 2.4.1.10) son una familia de enzimas que catalizan la transferencia de un grupo fructosilo desde una sacarosa a diferentes aceptores entre ellos otra molécula de sacarosa dando lugar a FOS sobre los que puede transferir otro grupo fructosilo para llegar a formar levan un polímero con aplicaciones en alimentación y biomedicina. Si el grupo fructosilo se transfiere sobre una molécula de agua da lugar a la hidrólisis de la sacarosa. En este trabajo se caracterizó una levansacarasa de *Z. mobilis* y los productos de reacción con sacarosa como sustrato se analizaron por cromatografía de intercambio aniónico con detector amperométrico de pulsos (HPAEC-PAD). Con objeto de optimizar el proceso biocatalítico la enzima se inmovilizó por atrapamiento en geles de alginato cálcico y las esferas resultantes se deshidrataron para formar DALGEEs (Dry ALGinate Entrapped Enzymes). Se probaron diferentes estrategias de inmovilización para minimizar la pérdida de la enzima por los poros. El efecto de la inmovilización en el comportamiento de la levansacarasa fue analizado.

\*Corresponding Author: paloma.santos@csic.es

Received: February 3 2015 Accepted: February 27 2015

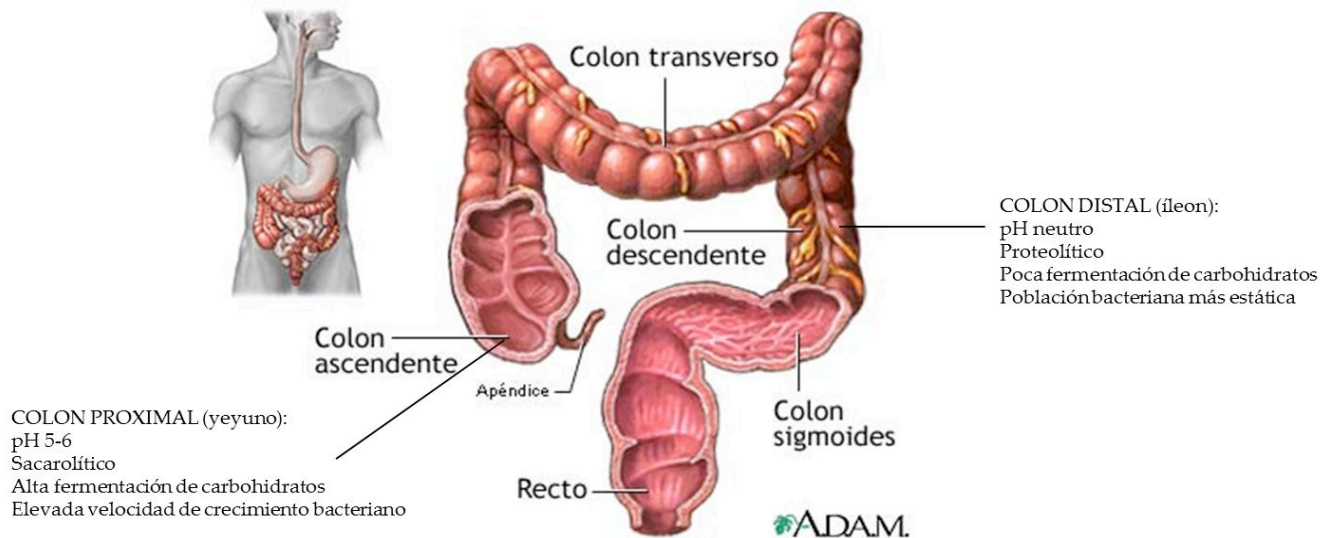
An Real Acad Farm Vol. 81 Nº 1 (2015) pp. 48-62

Language of Manuscript: Spanish

## 1. INTRODUCCIÓN

La microflora o microbiota intestinal se define como un complejo ecosistema dinámico de especies microbianas residentes en el intestino humano el cual es colonizado por un gran número de bacterias. Como puede observarse en la Figura 1 estos microorganismos van aumentando su concentración desde la boca hasta el recto siendo máxima en el colon con aproximadamente  $10^{12}$  UFC (Unidades Formadoras de Colonias) por gramo de contenido intestinal. El colon está habitado por unas cuatrocientas

especies bacterianas (1) y se divide en colon ascendente o proximal colon transversal colon descendente o distal y colon sigmoidal. Las bacterias presentes tienen actividades fluctuantes en función de la disponibilidad de sustrato pH potencial redox y distribución en el colon (2). Así los microorganismos residentes en el colon proximal tienen un suministro abundante de nutrientes provenientes de la dieta de modo que crecen muy rápido causando una disminución del pH. Sin embargo en el colon distal la disponibilidad de sustrato es menor las bacterias crecen más lentamente y el pH se acerca a la neutralidad (3).



**Figura 1.** Esquema de los microorganismos característicos de las distintas secciones del tracto gastrointestinal (adaptado de Mayo y Delgado 2003 (4)) y de las regiones del colon humano con sus correspondientes actividades bacterianas y diferencias fisiológicas (adaptado de Macfarlane 2008 (5)).

Las funciones metabólicas de la microbiota intestinal consisten en la fermentación de sustratos dietéticos no digeribles. En concreto la fermentación de los hidratos de carbono es una importante fuente de energía para la proliferación bacteriana en el colon y produce ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Mediante esta acidificación se favorece la absorción de minerales como Fe Mg y Ca. La actividad metabólica también incluye la producción de algunas vitaminas tales como vitamina K B12 biotina ácido fólico ácido pantoténico y la síntesis de aminoácidos a partir de amoníaco o de urea (6). Son muchos los factores que pueden influir sobre los niveles de estas poblaciones microbianas alterando el equilibrio bacteriano de la flora intestinal tales como la dieta el estrés malos hábitos administración de antibióticos etc (7). Recientemente en un estudio llevado a cabo con 22 individuos clasificaron 3 enterotipos humanos caracterizados por su microbiota intestinal: enterotipo 1 donde predominan *Bacteroides*; enterotipo 2 dominando la especie *Prevotella*; y enterotipo 3 con mayor proporción de *Ruminococcus*. Estos enterotipos parecen venir determinados fundamentalmente por la dieta a largo plazo (8). Lo fundamental es mantener un equilibrio entre las distintas especies bacterianas evitando la excesiva proliferación de aquellas potencialmente patógenas y obtener así una microflora intestinal sana (9). Este equilibrio se puede restablecer mediante la ingesta de alimentos funcionales o bien microorganismos vivos probióticos o bien mediante el consumo de oligosacáridos prebióticos.

Los prebióticos son ingredientes que son selectivamente fermentados por la microflora intestinal provocando cambios específicos tanto en su composición como en su actividad aportando efectos beneficiosos sobre la salud humana (10). Su consumo produce un aumento en la proporción de bacterias beneficiosas como *Lactobacillus*

y *Bifidobacterium* frente a otras especies mostrando una mejora en la salud del individuo (11). Conviene diferenciarlos de los probióticos que se definen como organismos exógenos vivos que resisten a la digestión normal alcanzando el colon e influyendo así de manera positiva en la composición de la microflora intestinal (1). Los simbióticos resultan de la combinación de probióticos y prebióticos en un mismo producto para mejorar la supervivencia e implantación de los microorganismos en el tracto gastrointestinal. Los principales efectos beneficiosos de los prebióticos se deben a la presencia de una flora predominantemente bifidogénica. Estos efectos se pueden dividir en tres: la acción inmunoprotectora la acción metabólica por la producción de AGCC y la acción nutricional ya que las bifidobacterias favorecen la síntesis de algunas vitaminas como B6 B12 etc. y ayudan a la absorción de Ca Mg Fe y Zn. Además los prebióticos son bajos en calorías y anticariogénicos.

Los prebióticos tienen una serie de ventajas frente a los probióticos: estimulan a toda la microbiota no sólo a una cepa; son más estables y se pueden añadir como aditivos a una gama más amplia de productos; y es más fácil que lleguen intactos al colon que las bacterias que tienen que sobrevivir al tracto digestivo.

En la Tabla 1 se detallan los carbohidratos aceptados como prebióticos hasta el momento. Los fructanos tipo inulina se encuentran en numerosas especies vegetales la oligofructosa se obtiene de la hidrólisis parcial de la inulina los FOS y GOS a partir de la síntesis enzimática de sacarosa y lactosa respectivamente y la lactulosa se obtiene industrialmente por isomerización de la lactosa.

Los FOS son oligosacáridos de D-fructosa (F) con una D-glucosa (G) terminal en los que los grupos fructosilo se unen mediante enlaces glicosídicos  $\beta(2\rightarrow1)$  formando la serie  $^1\text{F-FOS}$ . Cuando la unión se realiza mediante enlaces  $\beta(2\rightarrow6)$  se denomina serie  $^6\text{F-FOS}$  si se trata de una fructosa y  $^6\text{G-FOS}$  cuando la unión tiene lugar con la

glucosa (12) representándose algunas de estas estructuras en la Figura 2.

**Tabla 1.** Clasificación de carbohidratos aceptados como prebióticos (10).

Prebiótico	Grado de polimerización	Nombre comercial	Producción (Tm/año)	Enzima utilizada
Inulina (Fru) <sub>n</sub> -Glc	n = 2-60	Raftiline	> 20 000	Extracción directa
FOS Oligofructosa (Fru) <sub>n</sub> -Glc	n = 2-9	Actilight Raftilosa	12 000	Fructosiltransferasa Inulinasa
GOS (Gal) <sub>n</sub> -Glc	n = 2-5	Oligomate 50	15 000	β-galactosidasas
Lactulosa Gal-Glc	-	MLS-50	20 000	Catalizador básico

La obtención de FOS se lleva a cabo mediante la síntesis enzimática a partir de sacarosa. Las enzimas más empleadas para la obtención industrial de FOS son las fructosiltransferasas más concretamente las sacarosa fructosiltransferasas (EC 2.4.1.99) y las β-fructofuranosidasas (EC 3.2.1.26). La reacción de transfructosilación mediada por estas enzimas tiene lugar en dos pasos (13) formándose un intermedio fructosil-enzima por unión covalente de una molécula de fructosa al centro activo de la enzima y liberándose una molécula de glucosa. En el segundo paso se produce un ataque nucleofílico por un carbohidrato que actúa como molécula aceptora del fructosilo dando lugar a la síntesis del FOS correspondiente. En caso de que el nucleófilo sea una molécula de agua se forma la fructosa. La preferencia por una molécula de agua o de carbohidrato como molécula aceptora viene determinada por la tasa transferencia/hidrólisis de la enzima. Así se buscan enzimas con elevada tasa de transferencia/hidrólisis.

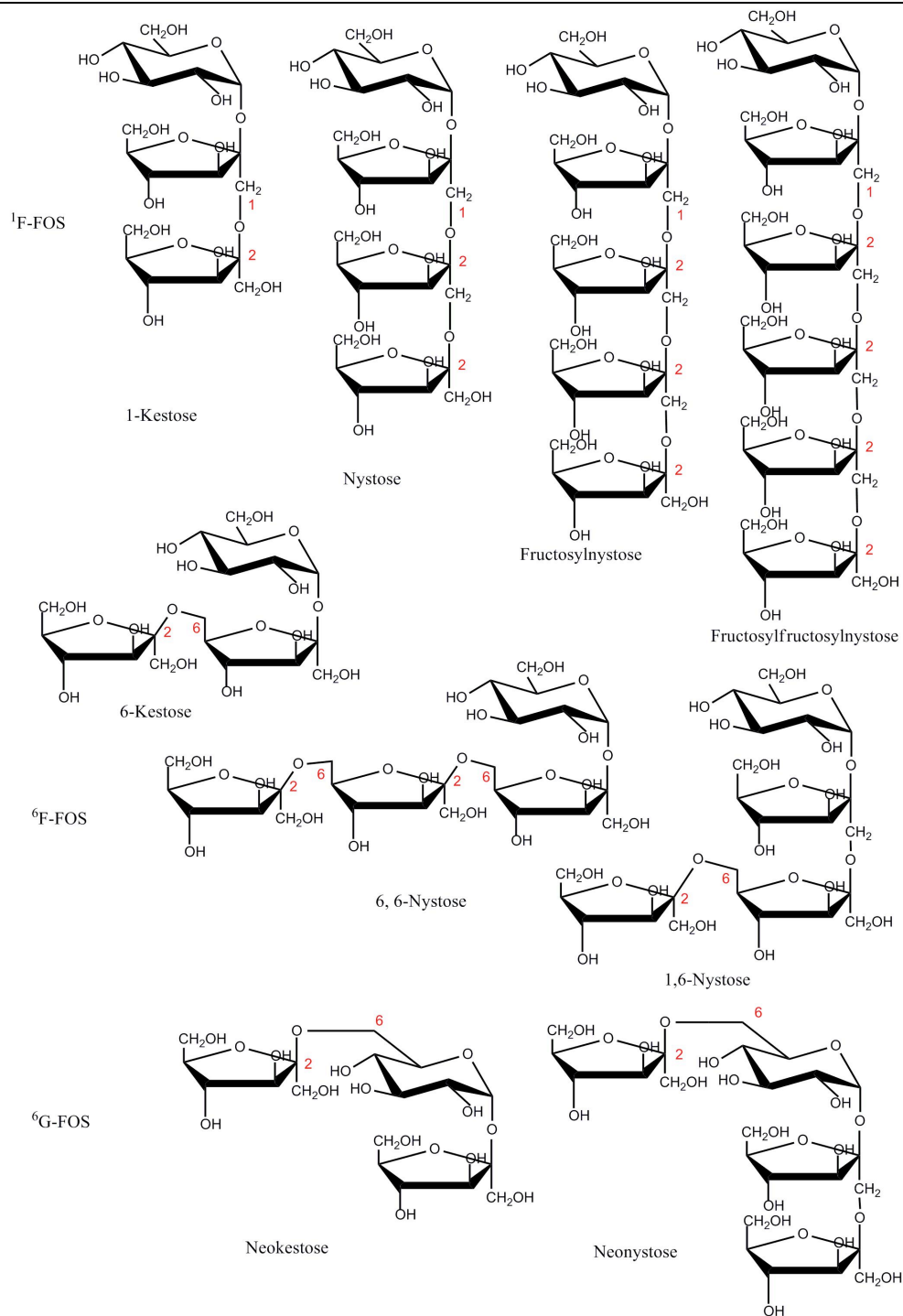
La mayoría de los FOS que se encuentran en el mercado son de tipo inulina tal como se observa en la Tabla 2 recomendándose un consumo diario de 10 g/ día (14).

Las levansacarasas (EC. 2.4.1.10) son enzimas que pertenecen a la familia de las hexosiltransferasas y que se encuentran en microorganismos como *Bacillus subtilis*, *Zymomonas mobilis*, *Microbacterium laevaniformans* o *Bacillus licheniformis* (15-17). También son conocidas como β-26-fructosiltransferasas porque catalizan la formación de levano un homopolímero de fructosa con enlaces β(2→6) con alguna ramificación β(2→1) (Figura 3) (18). El levano tiene aplicaciones en la industria alimentaria farmacéutica y cosmética además de ser un buen agente antitumoral debido a sus propiedades físicas (19). Aparte de la formación del levano las levansacarasas (LEV) producen FOS como se muestra en la Figura 3.

Los FOS producidos por LEV son el producto de la transfructosilación de un grupo fructosilo a una molécula de sacarosa o a otro FOS respondiendo a la fórmula GF<sub>n</sub> con n de 1 a 10. El tipo de enlace glicosílico que se forma entre las fructosas es principalmente del tipo β(2→6) produciendo entonces 6-kestosa y otros FOS de la misma familia (Figura 3). Sin embargo también se ha descrito la formación de otros FOS como la 1-kestosa y el resto de FOS de tipo inulina neokestosa blastosa etc. (Figura 3) por parte de algunas levansacarasas incluyendo la de *Z. mobilis* (20). Algunas levansacarasas también presentan actividad hidrolítica sobre el levano produciendo moléculas de fructosa levambiosa sacarosa oligómeros del levano o levano de bajo peso molecular (21).

La inmovilización de las enzimas productoras de FOS es deseable debido a la creciente demanda de este tipo de productos por la industria y los consumidores. La inmovilización de enzimas presenta una serie de ventajas frente a la utilización de enzimas solubles: aumenta la estabilidad de la enzima favorece la recuperación del producto y disminuye el coste total del proceso ya que el biocatalizador se puede reutilizar. Hay diferentes maneras de inmovilizar enzimas: por atrapamiento por adsorción en superficies por enlaces covalentes a un soporte o por enlaces covalentes entre ellas mismas para formar agregados.

La inmovilización por enlaces covalentes es más estable y reproducible que la inmovilización por adsorción o atrapamiento. Sin embargo presenta la desventaja de que puede afectar a la estructura de la enzima al interactuar con el soporte. Además muchas veces los tipos de enlaces que se forman requieren condiciones de reacción que no son favorables para la enzima. Por ejemplo para la formación de enlaces de tipo base de Schiff entre un aldehído de un soporte y un grupo amino de una enzima se requiere que el pH de la reacción sea de 10. A ese pH muchas enzimas pierden irreversiblemente su actividad.



**Figura 2.** Estructura de los fructooligosacáridos. **A** Serie de <sup>1</sup>F-FOS con enlaces β(1→2) entre fructosas. **B**. Serie de <sup>6</sup>F-FOS con enlaces β(2→6) entre fructosas. **C**. Serie de <sup>6</sup>G-FOS con enlaces β(2→6) entre fructosa y glucosa.

Tabla 2. Prebióticos con estructura tipo inulina comercializados actualmente.

Prebiótico	Nombre comercial	Empresa	Método de obtención
Inulina	Raftiline®	Beneo Orafiti (Bélgica)	Extracción a partir de achicoria
	Frutafit®	Sensus (Holanda)	
	Fibruline®	Cosucra (Bélgica)	
Oligofructosa	Raftilose®	Beneo Orafiti	Hidrólisis parcial de inulina
	Fructalose®	Sensus	
FOS	Fibrulose®	Cosucra	Síntesis enzimática a partir de sacarosa
	Actilight®	Beghin Meiji (Japón) Tereos (Francia)	

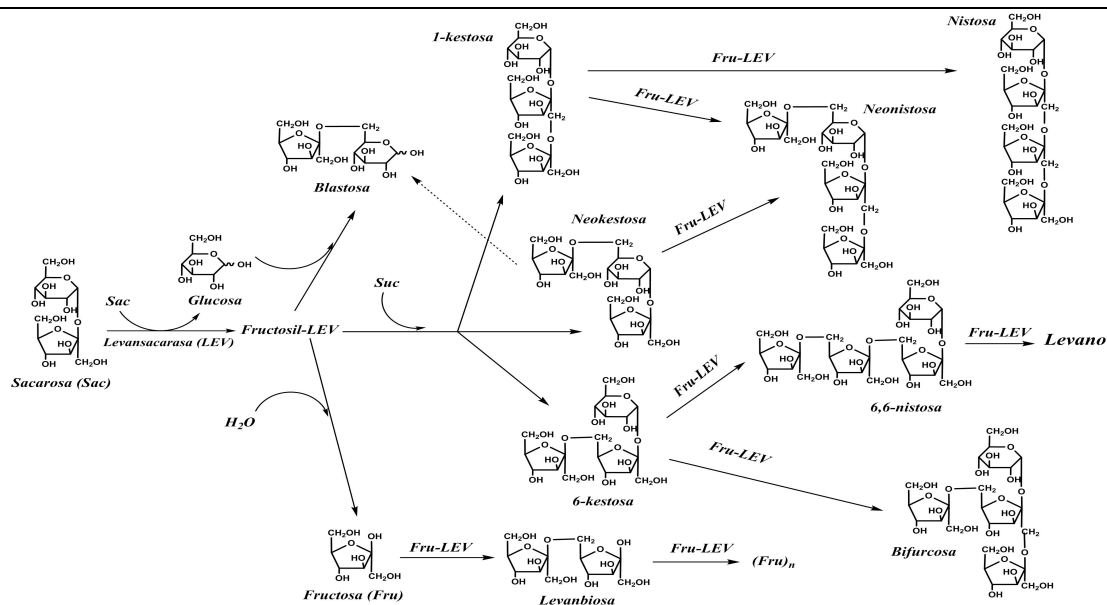


Figura 3. Reacciones catalizadas por las levansacarasa.

Ya que las principales industrias consumidoras de FOS son la alimentaria y la farmacéutica las técnicas por las que se producen los FOS tienen que ser adecuadas para el consumo humano evitando el uso de disolventes orgánicos o de sustancias tóxicas. La inmovilización por atrapamiento en geles de alginato cálcico ha sido reconocida como apta para el consumo humano (GRAS *Generally Recognized as Safe*) y se usa ampliamente en la conocida como gastronomía molecular. Sin embargo una de las desventajas de esta técnica es que si la enzima no es lo suficientemente grande puede lixiviar de las esferas de alginato. La levansacarasa de *Z. mobilis* tiene una propiedad descrita por Goldman *et al.* (22) por la cual a valores de pH por debajo de 5.0 forma microfibras que aumentan su peso molecular pudiendo evitar así su lixiviación. Otra estrategia para aumentar el tamaño de las proteínas es entrecruzarlas con glutaraldehído o más recientemente con transglutaminasas (TG). Las TGs son enzimas (EC 2.3.2.13) que catalizan la formación de enlaces covalentes entre grupos amino libres y el grupo  $\gamma$ -carboxiamida de las proteínas o de una glutamina de una

proteína. Los productos entrecruzados normalmente con alto peso molecular son muy resistentes al esfuerzo mecánico y a la degradación proteolítica (23). Las TGs ya se han usado para inmovilizar enzimas pero principalmente para unir covalentemente las enzimas a una matriz (24). Las TGs también son GRAS y se utilizan en la industria alimentaria para el procesamiento de carne pescado y lácteos.

Los objetivos de este trabajo fueron caracterizar la enzima levansacarasa de *Zymomonas mobilis* estudiar la síntesis enzimática de fructooligosacáridos catalizada por dicha enzima y optimizar la reacción para su uso en la industria mediante estrategias de inmovilización.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Enzimas y reactivos

La enzima levansacarasa de *Zymomonas mobilis* se adquirió como un preparado comercial de extracto extracelular en polvo de Amano (Japón). Los azúcares sacarosa glucosa fructosa 1-kestosa y nistosa eran de Sigma. La 6-kestosa la neokestosa y la blastosa fueron aisladas e identificadas previamente en el laboratorio. La

transglutaminasa se compró a la empresa japonesa Ajinomoto con el nombre comercial de Activa WM. El alginato sódico (Protanal LF 120 LS) se adquirió de FMC BioPolymer (USA). Todos los reactivos eran de la máxima pureza disponible en el mercado.

### 2.2. Caracterización de la enzima

La actividad catalítica de la preparación enzimática se determinó con el método del ácido 35-dinitrosalicílico (DNS) para azúcares reductores descrito por Miller (25) con sacarosa 100 g/l como sustrato. La actividad (U/mg) se definió como los  $\mu\text{mol}$  de azúcares reductores producidos en 1 minuto por miligramo de biocatalizador sólido comercial. La concentración de proteína total se determinó mediante el método de Bradford (26) con el reactivo de Bio-Rad. El peso molecular de la proteína se estimó analizando la preparación enzimática en un gel de poliacrilamida 10% con SDS teñido con Protoblue™ Safe (National Diagnosis) y comparando el tamaño de la banda principal con marcadores de peso molecular de proteínas (Novagen). La transferencia a una membrana de PVDF (Bio-Rad) se realizó con el Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad). La membrana se tiñó con Coomassie y las bandas de interés se cortaron y se enviaron a un laboratorio externo para los análisis de secuenciación del dominio N-terminal.

Se calcularon las condiciones óptimas de pH y temperatura en términos de actividad y estabilidad. Para la estabilidad frente al pH se prepararon las siguientes soluciones tampón: acetato sódico 50 mM a pH 3.0 3.6 4.0 4.4 y 5.0; y fosfato sódico 50 mM a pH 5.0 6.0 7.0 y 8.0. La enzima se incubó durante 24 h a 35°C en cada uno de los tampones y se midió la actividad residual con el método del DNS. Para el pH óptimo la actividad en sacarosa 100 g/l (1 ml) se midió a 35°C durante 20 min en los tampones descritos previamente. Posteriormente se midió la actividad por el método del DNS. Para medir la estabilidad frente a la temperatura la enzima se incubó durante 1 h a diferentes temperaturas entre 4-75°C y a pH 5.0 y la actividad residual se midió por el método del DNS. Para determinar la temperatura óptima se incubaron reacciones de 1 ml con sacarosa 100 g/l a diferentes temperaturas (25-75°C) y pH 5.0. La actividad de cada una de las reacciones se midió por el método del DNS.

### 2.3. Identificación y cuantificación de los productos de reacción

La identificación de los productos de la reacción de la levansacarasa con sacarosa como sustrato se llevó a cabo

mediante cromatografía de intercambio aniónico con un detector amperométrico de pulsos (HPAEC-PAD). Los oligosacáridos se analizaron empleando la columna CarboPack PA1 y los oligosacáridos y polisacáridos con la CarboPack PA200. Cinco unidades de levansacarasa (soluble o inmovilizada) por ml de reacción se añadieron a una solución de sacarosa 600 g/l en tampón acetato sódico 50 mM pH 5.6 y se incubó a 40°C con agitación suave. Se tomaron muestras a diferentes tiempos que fueron inactivadas con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.4 M filtradas en tubos de centrífuga con filtros de celulosa (0.45  $\mu\text{m}$  National Scientific) y diluidas con agua antes de ser inyectadas en el equipo cromatográfico. Las fases móviles utilizadas para cada columna se muestran en la Tabla 3. Sólo fue posible la cuantificación de aquellos productos de los que se disponía del estándar correspondiente para realizar una curva de calibrado. La concentración de los productos desconocidos se estimó como la diferencia entre la cantidad inicial de sacarosa y la suma de los productos conocidos. La actividad hidrolítica se determinó a partir de la cantidad de fructosa libre. La actividad de transfructosilación se calculó con la diferencia entre las cantidades de glucosa y fructosa libres. La tasa de transfructosilación/ hidrólisis se definió como el cociente entre ambas actividades.

Algunos de los productos de reacción desconocidos se purificaron mediante HPLC semipreparativa con una bomba Delta 600 (Waters) y un detector de índice de refracción (Varian). La columna semipreparativa era una Kromasil  $\text{NH}_2$  5  $\mu\text{m}$  (250 x 10 mm) y la fase móvil era acetonitrilo:agua 68:32 (v/v). Los productos aislados se enviaron a un laboratorio externo para los análisis de espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear (RMN).

### 2.4. Entrecruzamiento de la enzima con transglutaminasa (TG)

Para el entrecruzamiento de LEV se añadieron diferentes cantidades de transglutaminasa (100 U/g) a una solución de LEV y se incubaron durante 1 h a 35°C con agitación suave. Los productos del entrecruzamiento se visualizaron electroforéticamente en condiciones nativas y desnaturalizantes. La presencia de actividad se determinó con el reactivo cloruro de 235-tripheniltetrazolio (TTC) tras una incubación en sacarosa siguiendo el protocolo descrito por Mukasa *et al.* (27). Las reacciones se dejaron toda la noche a 4°C para observar la precipitación de conglomerados de alto peso molecular.

**Tabla 3. Composición de la fase móvil para HPAEC-PAD.** A NaOH 200 mM; B agua; C acetato sódico (AcONa) 200 mM; D AcONa 320 mM en NaOH 100 mM.

CarboPack PA1					CarboPack PA200				
t (min)	A (%)	B (%)	C (%)	Concentración	t (min)	A (%)	B (%)	D (%)	Concentración
0	10	90	0	20 mM NaOH	0	50	50	0	100 mM NaOH
13	10	90	0	20 mM NaOH	15	25	25	50	100 mM NaOH + 160 mM AcONa
20	50	30	20	100 mM NaOH + 40 mM AcONa	50	0	0	100	100 mM NaOH + 320 mM AcONa
30	50	30	20	100 mM NaOH + 40 mM AcONa	85	0	0	100	100 mM NaOH + 320 mM AcONa
35	50	0	50	100 mM NaOH + 100 mM AcONa	86	50	50	0	100 mM NaOH
37	50	0	50	100 mM NaOH + 100 mM AcONa	95	50	50	0	100 mM NaOH
40	10	90	0	20 mM NaOH					
50	10	90	0	20 mM NaOH					

### 2.5. Inmovilización

La enzima se inmovilizó por atrapamiento en alginato cálcico goteando una disolución 1:1 de enzima:alginato sódico 4% (p/v) sobre una disolución de CaCl<sub>2</sub> 200 mM. Este protocolo se siguió para la inmovilización de LEV a pH 4.0 a pH 5.6 y de LEV tras el entrecruzamiento con TG. El rendimiento de la inmovilización se calculó midiendo la actividad y la cantidad de proteína presente en las distintas soluciones de inmovilización y comparándolo con los datos de la solución enzimática inicial. Se utilizaron diferentes concentraciones iniciales de LEV y se determinó que la concentración más eficiente era 100 mg/ml de preparación enzimática ya que algo de la actividad se perdía con la incubación con TG.

Las esferas de alginato se deshidrataron mediante aireación forzada para formar “DALGEEs” (*Dry ALGinate Entrapped Enzymes*) (28) y se estudió su actividad y su estabilidad. El ensayo de lixiviación consistió en ciclos secuenciales de reacciones en batch y de lavados con sacarosa: los DALGEEs se incubaron con 500 µl de sacarosa 600 g/l en las condiciones óptimas de reacción durante 20 min a 40°C y 600 rpm durante cada ciclo de reacción. El medio de reacción se extrajo para analizar su actividad residual mediante el método del DNS y los biocatalizadores se lavaron dos veces con sacarosa fría antes de comenzar otro ciclo.

### 2.6. Visualización de los biocatalizadores con microscopía electrónica de barrido (SEM)

La visualización fue posible con la ayuda del Laboratorio de Técnicas No Destructivas del Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid (CSIC). Las esferas de alginato se observaron con el FEI INSPECT un SEM que puede trabajar a bajo vacío (0.08 a 0.60 torr) y que dispone de un detector de electrones secundarios y otro de *backscattering*. Tanto las esferas de alginato como los DALGEEs se analizaron con el FEI QUANTA 200 un

SEM que puede operar a tres modos de vacío: alto vacío bajo vacío (0.08 a 1 torr) y a condiciones ambientales o ESEM (1 a 20 torr) con un detector de electrones secundarios y otro de *backscattering*. Las esferas de alginato se analizaron en condiciones ambientales y los DALGEEs a bajo vacío porque la resolución era mejor. Este microscopio estaba acoplado a un detector de masas que funcionaba al trabajar a bajo vacío y que podía analizar fácilmente cualquier porción de la muestra.

## 3. RESULTADOS

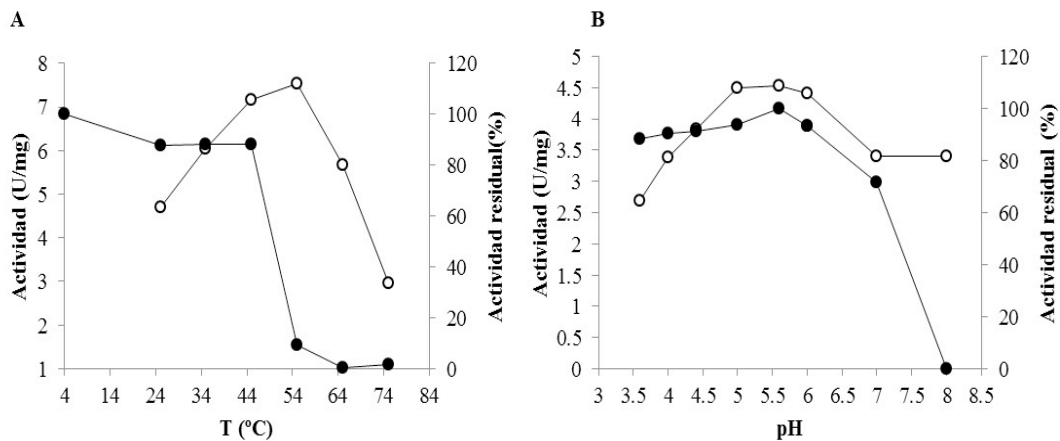
### 3.1. Actividad catalítica y condiciones óptimas de la enzima soluble

Se estudió el efecto de la temperatura en la actividad y estabilidad de la enzima soluble (Figura 4). Aunque observando las gráficas se puede comprobar que la temperatura óptima de LEV era 54°C la enzima no era estable a temperaturas superiores a 44°C (Figura 4A). En cuanto al pH el valor óptimo y el de máxima estabilidad era el mismo pH 5.6 (Figura 4B). Por lo tanto las condiciones seleccionadas para operar con la enzima soluble se fijaron en 40°C y pH 5.6. Bajo estas condiciones la actividad catalítica de enzima era 6.68 U por mg de preparado comercial. La preparación enzimática tenía un contenido en proteína del 6.25% (p/p).

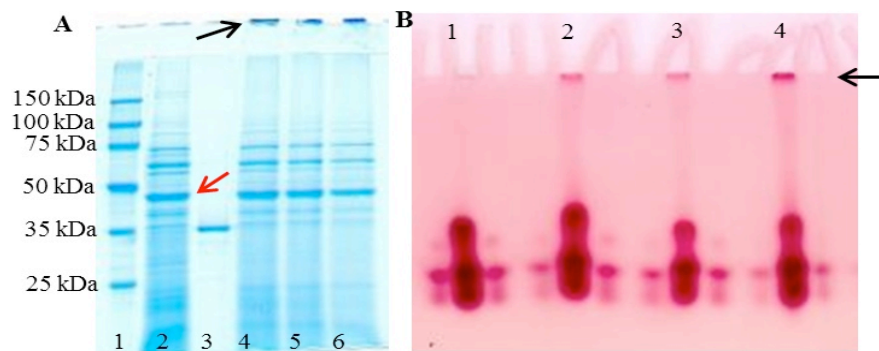
El peso molecular de la levansacarasa suponiendo que ésta es la banda mayoritaria era aproximadamente de 45 kDa según SDS-PAGE (Figura 5A flecha roja). Aparte de la banda mayoritaria se podían observar otras proteínas contaminantes en la preparación enzimática. Para dilucidar cuál de las bandas tenía actividad se hizo un zimograma y se encontraron tres bandas capaces de producir azúcares reductores (Figura 5B carril 1). Un gel en condiciones nativas se transfirió a una membrana de PVDF se recortaron las bandas de interés y se enviaron a un laboratorio externo (*Microbial Interactions and Processes Research Group HZI Alemania*) para la secuenciación de su dominio N-terminal. Los resultados mostraron que las

tres bandas correspondían a secuencias de levansacarasa por lo que se deduce que pueden ser isoformas de la misma. Con esto se concluye que toda la actividad que

presenta la preparación enzimática de Amano® se puede atribuir a la enzima levansacarasa de *Z. mobilis*.



**Figura 4.** Temperatura y pH óptimos. **A.** Estabilidad (círculos negros) expresada como actividad residual tras 24 h de incubación y temperatura óptima (círculos blancos) en U/mg de preparado comercial. **B.** Estabilidad (círculos negros) expresada como actividad residual tras 1 h de reacción y pH óptimo (círculos blancos) en U/mg de preparado comercial.



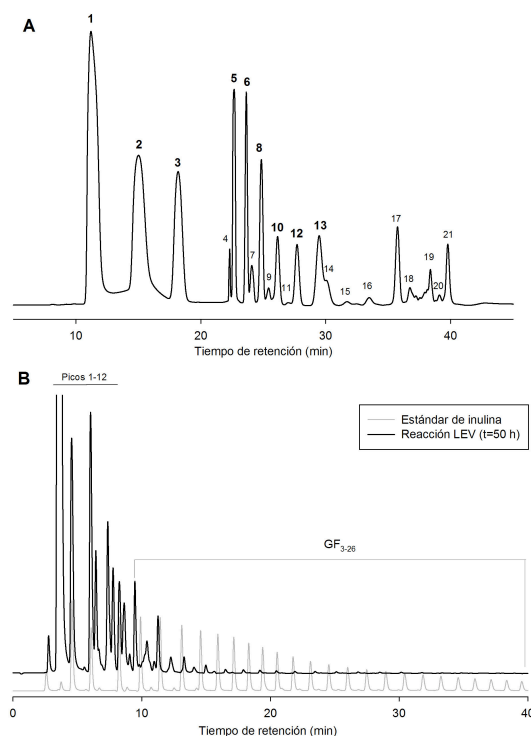
**Figura 5.** SDS-PAGE y actividad en gel (zimograma). **A.** SDS-PAGE. Carril 1: marcadores de peso molecular. Carril 2: LEV. Carril 3: TG. Carril 4: LEV + 10 U/ml TG. Carril 5: LEV + 20 U/ml TG. Carril 6: LEV + 40 U/ml TG. **B.** Zimograma. Carril 1: LEV. Carril 2: LEV + 10 U/ml TG. Carril 3: LEV + 20 U/ml TG. Carril 4: LEV + 40 U/ml TG.

### 3.2. Producción de fructooligosacáridos por la levansacarasa soluble

Se analizó una reacción con sacarosa 600 g/l y 5 U/ml de LEV soluble en tampón acetato 50 mM pH 5.6. Con la ayuda de estándares se identificaron los oligosacáridos 1-kestosa 6-kestosa blastosa neokestosa y nistosa mediante HPAEC-PAD con la columna CarboPack PA1 (Figura 6A). Se formaban también otros productos para los que no

disponíamos de estándares. El pico 13 se purificó por HPLC semipreparativa y se envió a un servicio externo para la identificación por masas y RMN. Los resultados de espectrometría de masas mostraron que el pico 13 era un tetrasacárido (MW = 666 g/mol). Finalmente los resultados de RMN confirmaron que se trataba de la 66-nistosa.





**Figura 6.** Cromatograma de los FOS producidos por LEV soluble. Condiciones de reacción: 5 U/ml de LEV soluble y 600 g/l de sacarosa en tampón acetato sódico 50 mM pH 5.6 **A.** HPAEC-PAD con columna CarboPack PA1 19 h de reacción. **B.** HPAEC-PAD con columna CarboPack PA200 50 h de reacción. Línea gris: estándar de inulina. 1: glucosa; 2: fructosa; 3: sacarosa; 5: 1-kestosa; 6: blastosa; 8: 6-kestosa; 10: neokestosa; 12: nistosa; 13: 66-nistosa.

La producción de FOS por la enzima soluble alcanzó su máximo cuando el 85% de la sacarosa se había consumido y la tasa de transfructosilación/hidrólisis era 2.2. El FOS más abundante en la reacción era 6-kestosa seguido de 1-kestosa y neokestosa (Figura 7 triángulos). Además el pico de blastosa era bastante importante en la reacción pero no disponíamos de cantidad suficiente para cuantificarlo.

Aparte de estos FOS se puede observar en los cromatogramas que la enzima es capaz de formar otros oligosacáridos de mayor grado de polimerización que no se pueden identificar. Dado que uno de los productos descritos para la levansacarasa es el levano se intentaron visualizar oligosacáridos cada vez más largos. Para ello se utilizó HPAEC-PAD con la columna CarboPack PA200.

Como estándar para aproximar el grado de polimerización se utilizó inulina (Raftiline® Orafti) (Figura 6B cromatograma gris) donde se puede observar toda la serie de la inulina desde GF2 hasta GF60. Las mismas muestras recogidas para el análisis de los FOS se analizaron con la nueva columna (Figura 6B). Al ser una columna más resolutive además de los FOS identificados en el experimento anterior también se pudieron identificar la difructosa (F2) fructosilnística (GF4) y la neonística; además de diversos productos de la serie de la inulina

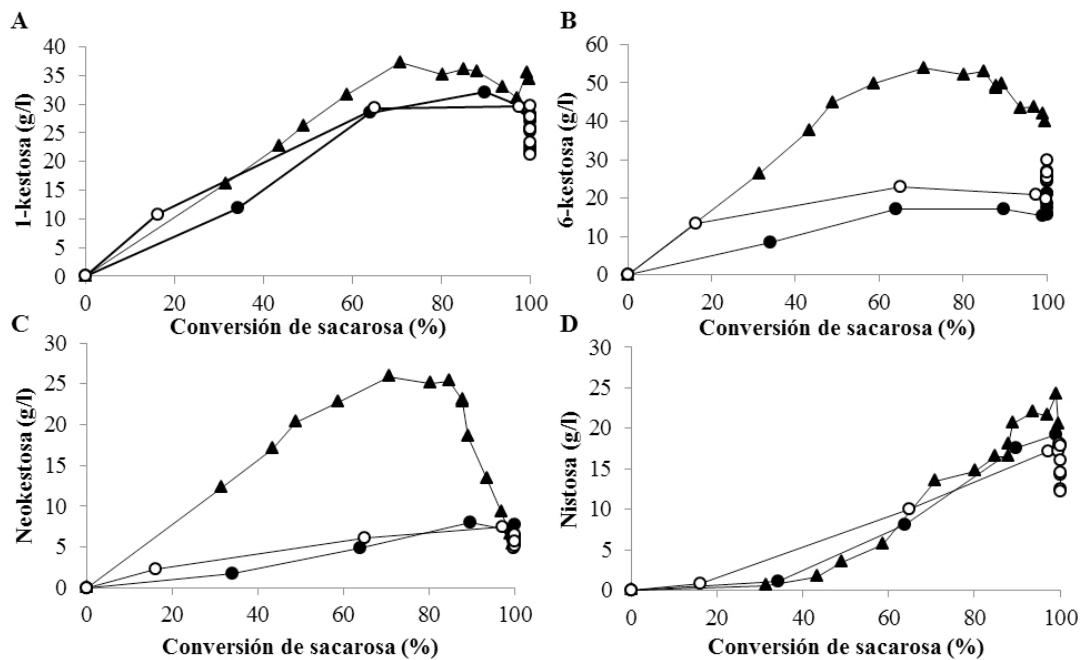
(GF<sub>n</sub> y F<sub>n</sub>). En la Figura 6B se puede observar cómo van apareciendo picos de azúcares cada vez más largos tanto de la serie de la inulina (<sup>1</sup>F-FOS) como otros sin identificar que probablemente pertenezcan la serie <sup>6</sup>F-FOS. Sin embargo el levano de peso molecular mucho más elevado no se pudo visualizar con este tipo de cromatografía.

### 3.3. Entrecruzamiento de la levansacarasa con transglutaminasa

Debido al reducido tamaño de LEV para su inmovilización por atrapamiento la enzima se entrecruzó usando la enzima transglutaminasa. Se probaron diferentes proporciones de ambas enzimas y LEV conservaba altos niveles de actividad (medida por DNS) incluso tras la adición de grandes cantidades de TG (resultados no incluidos). Para analizar el tamaño de los agregados las reacciones se estudiaron electroforéticamente. Aparecieron las mismas bandas que en el carril de LEV pero además se podía ver un conglomerado que no era capaz de penetrar en el gel (Figura 5A flecha negra). Para comprobar si esa banda era activa se estudió la actividad con un zimograma (Figura 5B carriles 2 3 y 4 flecha negra). La banda del agregado formado por entrecruzamiento era una vez más incapaz de entrar en el gel pero se pudo detectar actividad. Sin embargo una cantidad importante de LEV quedaba sin entrecruzar incluso tras el tratamiento con 40 U/ml de TG. También se pudo observar la precipitación de proteínas de

alto peso molecular cuando los eppendorfs con las reacciones se dejaban por la noche en el frigorífico (Figura

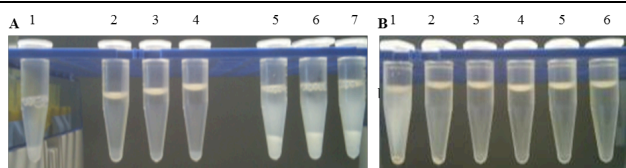
8A).



**Figura 7.** Comparación de la síntesis de FOS por LEV soluble (triángulos) LEV inmovilizada (círculos negros) y LEV inmovilizada previamente entrecruzada con TG (círculos blancos). **A.** 1-kestosa. **B.** 6-kestosa. **C.** Neokestosa. **D.** Nistosa.

### 3.4. Cambio de la estructura cuaternaria de LEV con el pH

Según Goldman y cols. (22) la levansacarasa de *Z. mobilis* existe en dos formas dependiendo del pH. A valores de pH por debajo de 5.0 forma microfibras que aumentan su tamaño mientras que a pH por encima de 5.0 la enzima se encuentra principalmente en forma de dímero soluble. Para observar este efecto se incubó LEV en tampones a diferentes pH y se dejaron toda la noche. Se observaron precipitados a pH 4.0 y en menor medida a pH 5.0 (Figura 8B) aunque en ambos casos significativamente menos que tras el entrecruzamiento con TG. También se incubó LEV sola en las mismas condiciones para comparar los resultados.



**Figura 8.** Precipitación de agregados de alto peso molecular. **A.** Precipitación tras el entrecruzamiento con TG. 1: LEV 20 mg/ml. 2 3 y 4: LEV 20 mg/ml tras 1 h de reacción con 1 5 y 10 U/ml de TG respectivamente. 5 6 y 7: LEV 20 mg/ml tras 2 h de reacción con 10 20 y 40 U/ml de TG respectivamente. **B.** Precipitación de microfibras de LEV formadas a bajo pH. 1 2 y 3: LEV 20 mg/ml en tampón acetato pH 4.0 5.0 y 6.0 respectivamente. 4 5 y 6: LEV 20 mg/ml en tampón fosfato pH 6.0 7.0 y 8.0 respectivamente.

### 3.5. Inmovilización

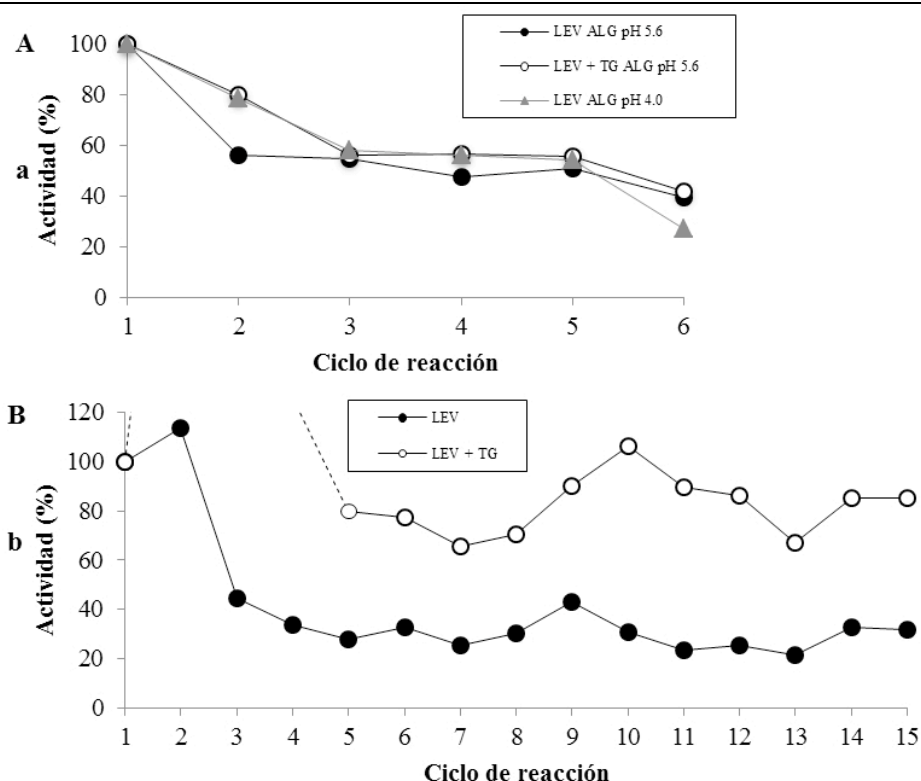
La enzima LEV se inmovilizó siguiendo las dos estrategias descritas para aumentar su tamaño: entrecruzamiento con TG y ajustando el pH por debajo de 5.0. La enzima también se inmovilizó en su forma soluble a pH 5.6 para comparar los resultados. Primero se inmovilizaron por atrapamiento para formar esferas de alginato (Figura 11E izq.). Aunque el rendimiento de la inmovilización fue superior al 90% (Tabla 4) estas esferas demostraron no mostraron una gran estabilidad operacional en batch; las tres estrategias perdían la enzima durante los primeros 4 ciclos de reacción (Figura 9A). Para intentar evitar el problema de la lixiviación las esferas de alginato se secaron para formar DALGEEs (*Dry ALGinate Entrapped Enzymes*) (Figura 11E dcha.). Esta estrategia resultó ser más eficaz. El tamaño de los DALGEEs es aproximadamente un tercio de las bolas de alginato (Figura 11). Los mejores resultados de actividad frente a lixiviación se obtuvieron con la estrategia de la TG. Tras 15 ciclos de reacción el biocatalizador conservaba el 85% de su actividad inicial (Figura 9B) es decir aproximadamente 18 U por gramo de biocatalizador. El aumento de actividad tras el primer ciclo de reacción se puede explicar por la hidratación de los DALGEEs al entrar en contacto con el medio líquido de la reacción y por lo tanto la ligera relajación de la red de alginato que facilita el intercambio entre sustratos y productos. Los DALGEEs a pH 4.0 tenían más actividad al principio pero al estudiar la lixiviación con sacarosa 600 g/l a pH 4.0 la sacarosa daba señal en el ensayo de DNS probablemente

como consecuencia de una hidrólisis ácida haciendo imposible el análisis de los datos (resultados no incluidos).

**Tabla 4.** Rendimiento de la inmovilización de LEV en alginato cálcico. La actividad se midió en dos puntos durante la inmovilización: tras la incubación con TG y tras la inmovilización.

	Rendimiento de incubación *	Rendimiento de inmovilización	Rendimiento total
LEV	58%	94%	55%
LEV + TG	59%	92%	54%

\* Tras 2 h de incubación con TG a 35°C pH 5.6 600 rpm



**Figura 9.** Estabilidad operacional de los biocatalizadores de alginato. **A.** Actividad residual de las bolas de alginato de LEV inmovilizada a pH 4.0 a pH 5.6 y LEV inmovilizada previamente entrecruzada con TG a pH 5.6 tras varios ciclos de reacción con sacarosa 600 g/l. **B.** Actividad residual de los DALGEEs de LEV a pH 5.6 y LEV + TG tras varios ciclos de reacción con sacarosa 600 g/l.

### 3.5. Producción de fructooligosacáridos por la levansacarasa inmovilizada

Una vez que la enzima estuvo inmovilizada se estudiaron reacciones en las mismas condiciones que con la enzima soluble y las muestras se analizaron por HPAEC-PAD. Básicamente se formaron los mismos productos que con la enzima soluble solo que en distinta proporción (Figura 7 círculos negros y blancos). Además las reacciones con biocatalizadores inmovilizados parecían ir más rápidas a pesar de haber puesto las mismas unidades. Esto pudo ser causado por el efecto observado en el ensayo de lixiviación por el cual la actividad aumentaba tras el primer ciclo de reacción.

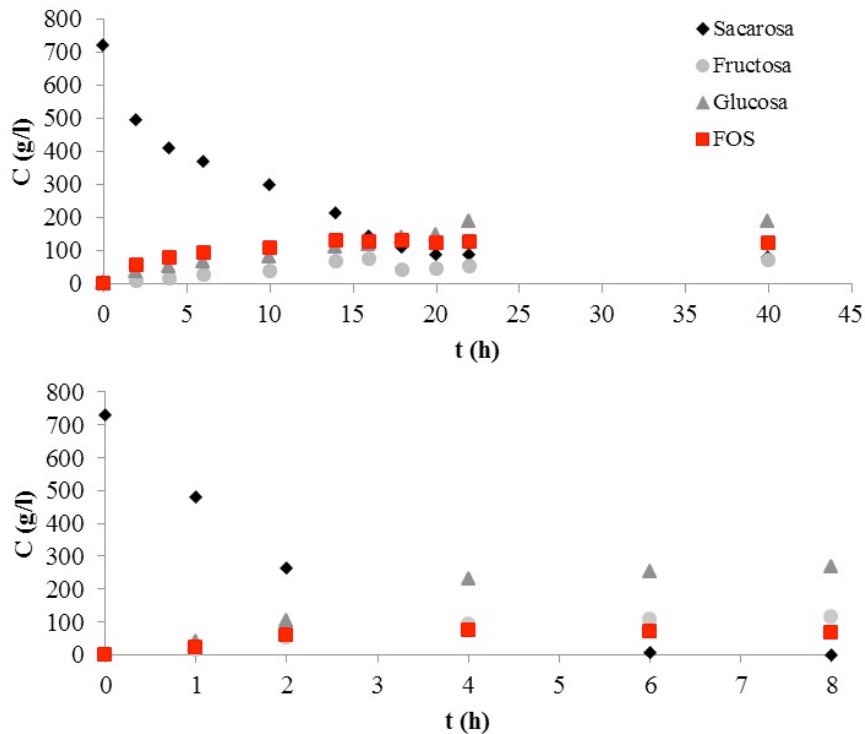
Aunque inicialmente ambas reacciones (con la enzima soluble e inmovilizada) se estudiaron con el mismo número de unidades de LEV por ml este efecto puede haber causado que la actividad de los DALGEEs fuera en

realidad mayor que la que se calcula con un solo ensayo de DNS. Sin embargo lo que parece bastante claro es que la enzima es capaz de consumir casi toda la sacarosa presente en la reacción y permanece activa incluso después de 129 h de reacción (datos no mostrados). No hubo diferencias significativas entre los productos formados por LEV inmovilizada sola y LEV previamente entrecruzada con TG aunque se pudo observar un ligero aumento en la producción de FOS en la estrategia con TG que tenían una tasa de transfructosilación/ hidrólisis de 1.8.

La producción de FOS con LEV inmovilizada alcanzó su máximo cuando casi toda la sacarosa se había consumido (Figura 10B) y la tasa de transfructosilación hidrólisis era de 1.6. Una vez que la conversión de sacarosa fue total la concentración de 1-kestosa y neokestosa empezó a caer (Figuras 7A y 7C) mientras que la concentración de 6-kestosa parecía aumentar (Figura 7B). Esto indica que probablemente LEV está actuando

sobre la 1-kestosa produciendo oligosacáridos más largos. Estos oligosacáridos se pueden observar en los tiempos largos de retención de los cromatogramas (Figura 6) pero

como su identidad es desconocida no se puede saber su concentración exacta.



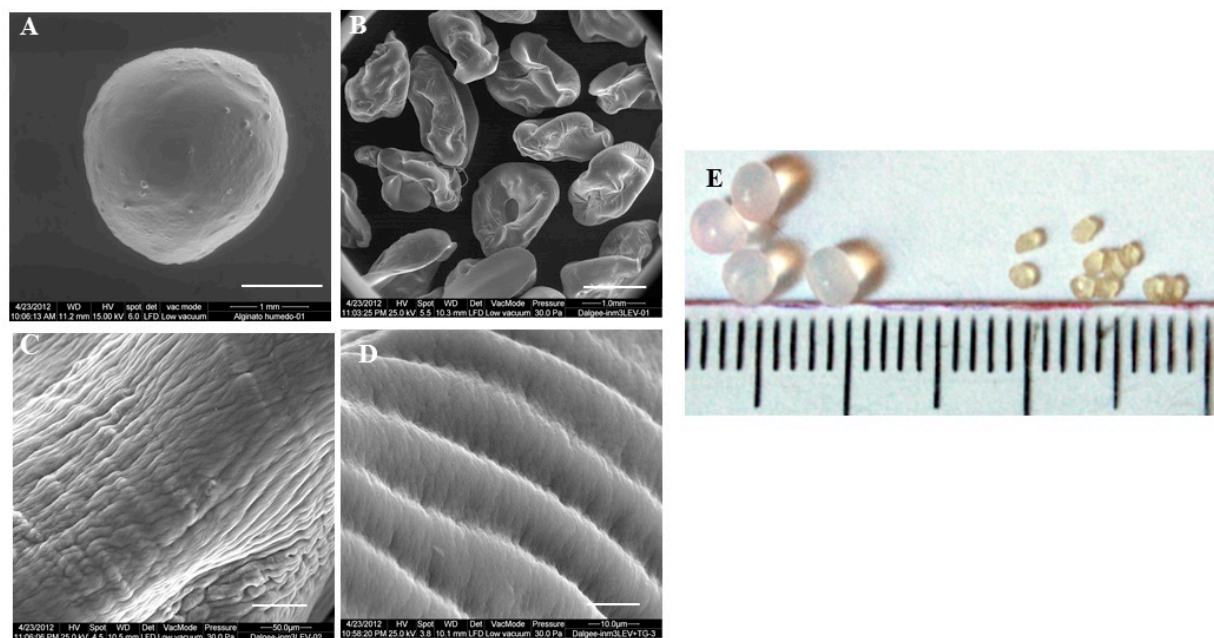
**Figura 10.** Variación de la concentración de sacarosa glucosa fructosa y suma de FOS conocidos frente al tiempo de reacción. Reacción con LEV soluble (primer gráfico). Reacción con LEV inmovilizada (segundo gráfico).

### 3.6. Visualización de los biocatalizadores mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las esferas de alginato son muy difíciles de observar con microscopía electrónica debido a su alto contenido en agua (90%). Las condiciones de alto vacío dentro de los microscopios hacen que las esferas se deshidraten y se pierda la estructura original de la red de alginato cálcico. Sin embargo con las condiciones de bajo vacío del SEM FEI INSPECT las bolas de alginato se pudieron visualizar cuando habían perdido solo un tercio de su volumen (Figura 11A) y se puede apreciar lo que parece que son los poros por los que se podría estar produciendo la difusión

de sustratos y productos. Cuando se intentó observar las bolas de alginato en condiciones ambientales la resolución no era muy buena (no se muestra la imagen).

Los DALGEEs se observaron con en un microscopio SEM FEI QUANTA 200 en condiciones de bajo vacío (Figura 11 B-D). A pesar de acercarse bastante a la superficie no se pudo detectar ningún poro. Sin embargo se pueden ver unas franjas paralelas que pueden ser producto de la deshidratación pero también nos podría estar dando una idea de la estructura interna de la red de alginato. Algunos DALGEEs presentaban cristales de NaCl y de CaCl<sub>2</sub> en la superficie procedentes de los tampones y disoluciones utilizados durante la inmovilización.



**Figura 11.** Visualización de las esferas de alginato y los DALGEEs. **A.** Esfera de alginato visualizada con SEM FEI INSPECT en condiciones de bajo vacío. Escala: 1 mm. **B y C.** DALGEEs de LEV visualizados con SEM FEI QUANTA 200 en condiciones de bajo vacío (30.0 Pa). Escala B: 1.0 mm. Escala C: 50.0  $\mu\text{m}$ . **D.** Superficie de DALGEE de LEV entrecruzado con TG visualizado con SEM FEI QUANTA 200 en condiciones de bajo vacío (30.0 Pa). Escala: 10.0  $\mu\text{m}$ . **E.** Fotografía de esferas de alginato (izq.) y DALGEEs (dcha.).

#### 4. DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en la caracterización de la levansacarasa de *Z. mobilis* parecen concordar con estudios previos sobre esta enzima (16, 20, 29, 30).

En cuanto a las tres bandas con actividad reductora de azúcares presentes en el gel de actividad se enviaron a un laboratorio externo para secuenciar su extremo N-terminal y comprobar qué clase de enzimas son probablemente las dos más importantes correspondan a las dos levansacarasas de *Z. mobilis* descritas en su genoma (números de acceso en GeneBank AAV88999.2 y AAV88998.1 (31).

En cuanto a la producción de FOS se encontró cierta discordancia entre los resultados publicados previamente y nuestros resultados. Además nunca antes se había hecho un estudio cromatográfico en detalle. Mientras que en la bibliografía la 6-kestosa está definida como el principal producto de LEV (20) encontramos que esto era verdad solo durante las primeras horas de reacción usando la enzima soluble. Por el contrario con la enzima inmovilizada el principal producto era la 1-kestosa.

También hubo diferencias en las cantidades de FOS producidas por la enzima soluble e inmovilizada. La enzima soluble sintetizaba considerablemente más 6-kestosa y neokestosa que la enzima inmovilizada. También se producía ligeramente más 1-kestosa con la enzima soluble pero no de manera significativa. Por otra parte la nistosa presentaba prácticamente la misma tasa de producción en todas las reacciones. Esto significa un

cambio de selectividad en la producción de trisacáridos cuando la enzima se inmoviliza.

En cuanto a la producción de azúcares más largos con el uso de la columna CarboPack PA200 se pudo visualizar el crecimiento de los FOS hasta un grado de polimerización de aproximadamente GF20. Muestras de tiempos más largos no mostraban tantos picos de alto grado de polimerización. Esto puede ser debido a que todo se ha transformado ya en levano de más peso molecular que no es posible visualizar por cromatografía.

Cuando la enzima se inmovilizó por atrapamiento en alginato cálcico se observaba lixiviación incluso cuando LEV había sido entrecruzada con TG. Sin embargo con la estrategia de los DALGEEs previo entrecruzamiento con TG se conservaba un 85% de la actividad tras 15 ciclos de reacción. Siempre se obtenía el mismo perfil de actividad en el que el segundo ciclo de reacción daba más actividad que el primero. Una posible explicación a este fenómeno es que cuando las esferas se secan y se quedan compactas algunas moléculas de enzimas no son accesibles para el sustrato. Cuando los DALGEEs se incuban en una disolución de sacarosa en el primer ciclo se rehidratan ligeramente haciendo la red de inmovilización más flexible y facilitado la difusión de sustratos y productos. Es interesante comprobar que los DALGEEs no vuelven a su forma original de esferas de alginato totalmente hidratadas debido a la baja actividad del agua ( $a_w$ ) de la disolución de sacarosa empleada.

## 5. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos la enzima levansacarasa es muy adecuada para la producción a escala industrial de FOS. A diferencia de otras enzimas relacionadas (p.ej.  $\beta$ -fructofuranosidasas) la levansacarasa produce una mezcla compleja de productos que podrían tener efectos sinérgicos en cuanto a sus propiedades prebióticas. La amplia gama de FOS producidos por esta enzima abre posibilidades más allá de los FOS de la familia de la inulina en los que están centrados la mayor parte de los productos actualmente comercializados.

De las estrategias de inmovilización ensayadas la mejor fue el entrecruzamiento con TG siguiendo la metodología de los DALGEEs aunque una cantidad importante de LEV quedara sin entrecruzar. Esta estrategia no solo no afectó a la actividad de LEV sino que parecía aumentar ligeramente la producción de FOS en comparación con la enzima inmovilizada sin entrecruzar. El cambio en la selectividad puede ser interesante si se requiere la producción de un tipo de FOS en particular como por ejemplo la 1-kestosa o la nistosa.

El método de inmovilización propuesto que combina atrapamiento en alginato cálcico con entrecruzamiento con transglutaminasa es muy interesante para la producción de FOS y su aplicación a la industria alimentaria debido a que todos los materiales son aptos para el consumo humano. La optimización de esta técnica supondría una fácil producción de FOS prebióticos a partir de un sustrato barato y fácilmente accesible como es la sacarosa.

También sería interesante optimizar la producción del polisacárido sintetizado por la levansacarasa (levano) debido a su capacidad antitumoral (19) anticolesterolemica antioxidante (32) y antidiabética entre otras. Dichos procesos permitirían reducir el elevado precio que tiene el levano a día de hoy.

## 6. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado con proyecto del Ministerio de Ciencia e Innovación (BIO2010-20508-C04-01) y otro del Ministerio de Economía y Competitividad (BIO2013-48779-C4-1-R). Agradecemos a Amano (Japón) por su amable donación de la enzima levansacarasa.

## 7. REFERENCES

1. Fuller R. Probiotics in man and animals. *The Journal of Applied Bacteriology* 1989; 66: 365-78.
2. Cummings J H, Macfarlane G T. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *The Journal of Applied Bacteriology* 1991; 70: 443-59.
3. Gibson G R, Rastall R A. *Prebiotics: development and application*. Chichester: John Wiley & Sons 2006.
4. Macfarlane G T, Steed H. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology* 2008; 104: 305-44.

5. Mayo B, Delgado S. Probióticos y salud. *Alimentación y salud* 2003; 10: 61-70.
6. Guarner F. [The colon as an organ: habitat of bacterial flora]. *Nutrición Hospitalaria* 2002; 17: 7-10.
7. Ottman N, Smidt H. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2012; 2: 104.
8. Arumugam M, Raes J. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011; 473: 174-80.
9. Zoppi G. Probiotics and prebiotics in the treatment of infections due to vancomycin-dependent *Enterococcus faecalis* and of imbalance of the intestinal ecosystem (dysbiosis). *Acta paediatrica* 1997; 86: 1148-50.
10. Roberfroid M. Prebiotics: the concept revisited. *The Journal of Nutrition* 2007; 137: 830s-7s.
11. Gibson G R, Roberfroid M B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition* 1995; 125: 1401-12.
12. Plou F J, Segura A G. Application of Glycosidases and Transglycosidases in the Synthesis of Oligosaccharides. In: Polaina J, MacCabe A. Eds. Springer Netherlands; 2007: p. 9
13. Plou F J, Martín M T. Glucosyltransferases acting on starch or sucrose for the synthesis of oligosaccharides. *Canadian Journal of Chemistry* 2002; 80: 743-752.
14. Bouhnik Y, Raskine L. The capacity of short-chain fructo-oligosaccharides to stimulate faecal bifidobacteria: a dose-response relationship study in healthy humans. *Nutrition Journal* 2006; 5: 8.
15. Park H E, Park N H. Enzymatic synthesis of fructosyl oligosaccharides by levansucrase from *Microbacterium laevaniformans* ATCC 15953. *Enzyme and Microbial Technology* 2003; 32: 820-827.
16. Lyness E W, Doelle H W. Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology letters* 1983; 5: 345-350.
17. Chambert R, Treboul G. Kinetic studies of levansucrase of *Bacillus subtilis*. *European Journal of Biochemistry* 1974; 41: 285-300.
18. Han Y W. Microbial levan. *Advances in Applied Microbiology* 1990; 35: 171-94.
19. Dahech I, Belghith K S. Partial purification of a *Bacillus licheniformis* levansucrase producing levan with antitumor activity. *International Journal of Biological Macromolecules* 2012; 51: 329-335.
20. Bekers M, Laukevics J. Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. *Process Biochemistry* 2002; 38: 701-706.
21. Jang K H, Ryu E J. Levan fructotransferase from *Arthrobacter oxydans* J17-21 catalyzes the formation of the di-D-fructose dianhydride IV from levan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003; 51: 2635-2636.

22. Goldman D, Lavid N. Two active forms of *Zymomonas mobilis* levansucrase. The Journal of biological chemistry 2008; 283: 32209-32217.
23. Griffin M, Casadio R. Transglutaminases: Nature's biological glues. Biochemical Journal 2002; 368: 377-396.
24. Kamata Y, Ishikawa E. Enzyme immobilization on ion exchangers by forming an enzyme coating with transglutaminase as a crosslinker. Biosciences Biotechnology and Biochemistry 1992; 56: 1323-1324.
25. Miller G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry 1959; 31: 426-428.
26. Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry 72 248-54 (1976)
27. Mukasa H, Shimamura A. Direct activity stains for glycosidase and glucosyltransferase after isoelectric focusing in horizontal polyacrylamide gel layers. Analytical Biochemistry 1982; 123.
28. Fernández-Arrojo L, Rodríguez-Colinas B. Dried alginate-entrapped enzymes (DALGEEs) and their application to the production of fructooligosaccharides. Process Biochemistry 2013; 48: 677-682.
29. Yanase H, Iwata M. Purification crystallization and properties of the extracellular levansucrase from *Zymomonas mobilis*. Biosciences Biotechnology and Biochemistry 1992; 56: 1335-1337.
30. Crittenden R G, Doelle H W. Identification and characterisation of the extracellular sucrases of *Zymomonas mobilis* UQM 2716 (ATCC 39676). Applied Microbiological Biotechnology 1994; 41: 302-308.
31. Seo J S, Chong H. The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. Nature Biotechnology 2005; 23: 63-8.
32. Belghith K S, Dahech I. Microbial production of levansucrase for synthesis of fructooligosaccharides and levan. International Journal of Biological Macromolecules 2012; 50: 451-8.