

00551



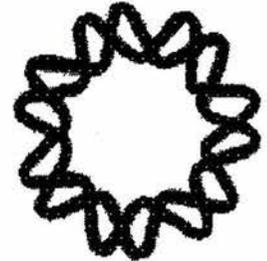
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**

Programa de Maestría y Doctorado en

Ciencias Bioquímicas

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis



**Caracterización y Aplicación de la Inulosacarasa de  
*Leuconostoc citreum* CW28**

TESIS que para obtener el título de :

**Maestra en Ciencias**

Presenta:

**Ma. Elena Ortiz Soto**

Tutor:

**Dr. Agustín López-Munguía Canales**

Cuernavaca, Morelos.

2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Tecnología Enzimática del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Agustín López-Munguía Canales.

Durante la realización de los estudios de Maestría, se contó con una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de registro 165334 y de la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP, UNAM, México).

El proyecto contó con el financiamiento del Comité Técnico del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con número IN238202-3 y del consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con registro 40609-Z.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.  
NOMBRE: Ma. Elena Ortiz Soto  
FECHA: 30. Enero - 2004  
FIRMA: [Firma]

A Mamá y a Chabelí

---

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Agustín López-Munguía Canales, por permitirme formar parte de su grupo y por la confianza.

A los Drs. Alfredo Martínez Jiménez y Rafael Vázquez Duhalt por los comentarios y aportaciones en el desarrollo del proyecto.

Al jurado revisor de esta tesis por sus comentarios y sugerencias:

Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo

Dr. Agustín López-Munguía Canales

Dr. Mariano García-Garibay

Dr. Leobardo Serrano Carreón

Dra. Gloria Saab Rincón

A los T.L. Fernando Gonzáles y Aurelia Ocampo por el apoyo técnico brindado.

Al Dr. Leobardo Serrano Carreón, a los T.L. Mario Alberto Caro Bermudez y Miriam Ortiz García por el apoyo en la planta piloto para la obtención de inulina y liofilización.

Al Dr. Carlos Felipe Peña Malacara por su ayuda en la determinación de pesos moleculares.

---

A mi familia, por estar siempre: a Mamá por el amor y las lecciones de vida, a Chabelí por el apoyo incondicional en cada una de mis decisiones, acertadas o no. A mis hermanos: Javier, Manuel y Fabian, por regresar, por la música, la literatura y el robot de luces rojas. A Chabelí, Berenice y Ceci, por la experiencia de crecer, con absolutamente todo lo que eso implica. A Era.

Especialmente a mi padre, por quedarse conmigo.

A los, las y ex López: Edmundo, Male, Clarita, Vero, Fer, Alina, Alex, Sandra, Sandrita, Chelo, Rebeca, Marce, Angela, Rubén, Xoch, Vane, Lolita y Gina por cada momento compartido.

A Gina, Alina, Marce, Gustavo, Sandra, Gaby, Sandrita, Fer y Julio, por todo el cariño, por participar de esta historia y sobre todo por escuchar.

A Manuel.

---

**ÍNDICE DE FIGURAS****ÍNDICE DE TABLAS**

|   |    |
|---|----|
| <b>RESUMEN</b>  | 1  |
| <b>INTRODUCCION</b>   | 2  |
| <b>1 GENERALIDADES</b>  | 5  |
| 1.1 Fructosiltransferasas   | 5  |
| 1.1.1 Fructosiltransferasas de plantas  | 6  |
| 1.1.2 Fructosiltransferasas de hongos   | 9  |
| 1.1.3 Fructosiltransferasas de bacterias  | 11 |
| 1.1.3.1 Mecanismo de reacción   | 11 |
| 1.1.3.2 Estructura  | 14 |
| 1.1.4 Inulina, oligosacáridos y levana  | 19 |
| <b>OBJETIVOS</b>  | 23 |
| <b>2. MATERIALES Y METODOS</b>  | 24 |
| 2.1 Condiciones de crecimiento y medio de cultivo   | 24 |
| 2.2 Curva de crecimiento de <i>Leuconostoc citreum</i>                                      | 24 |
| 2.3 Electroforesis de proteínas   | 25 |
| 2.4 Producción de la Inulosacarasa asociada a células de <i>Leuconostoc citreum</i><br>CW28 | 26 |
| 2.5 Extracción de la Inulosacarasa de <i>Leuconostoc citreum</i>                            | 26 |
| 2.6 Cuantificación de proteína  | 27 |
| 2.7 Caracterización de los productos obtenidos  | 27 |
| 2.7.1 Identificación del manitol  | 27 |
| 2.8 Determinación de la actividad enzimática  | 28 |
| 2.9 Determinación de constantes cinéticas   | 29 |
| 2.10 Determinación de la relación hidrólisis/ transferencia                                 | 29 |
| 2.11 Reacciones de aceptor  | 30 |
| 2.12 Producción de inulina en planta piloto   | 31 |

---

|  |    |
|--|----|
| 2.13 Análisis de la inulina                                      | 32 |
| 2.13.1 Determinación del peso molecular                          | 32 |
| 2.13.2 Pureza  | 32 |
| <b>3 RESULTADOS</b>  | 33 |
| 3.1 Condiciones de crecimiento                                   | 33 |
| 3.2 Extracción de la Inulosacarasa de <i>Leuconostoc citreum</i> | 36 |
| 3.3 Caracterización de los productos obtenidos                   | 37 |
| 3.3.1 Producción de manitol                                      | 37 |
| 3.4 Determinación de las constantes cinéticas                    | 39 |
| 3.5 Determinación de la relación hidrólisis/Transferencia        | 40 |
| 3.6 Reacciones de aceptor  | 42 |
| 3.7 Producción de inulina en planta piloto                       | 43 |
| 3.8 Análisis de la inulina                                       | 44 |
| 3.8.1 Determinación del peso molecular                           | 44 |
| 3.8.2 Pureza   | 47 |
| <b>CONCLUSIONES</b>  | 48 |
| <b>BIBLIOGRAFIA</b>  | 50 |

---

**ÍNDICE DE FIGURAS**

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Figura 1</b>  | Reacciones catalizadas por las fructosiltransferasas  | 5  |
| <b>Figura 2</b>  | Ejemplo de diferentes tipos de fructanas  | 8  |
| <b>Figura 3</b>  | Mecanismo de Ping Pong Bi-Bi  | 13 |
| <b>Figura 4</b>  | Diagrama de la levansacarasa de <i>B. subtilis</i>  | 16 |
| <b>Figura 5</b>  | Distancia y contactos entre la levansacarasa de <i>B. subtilis</i> y la sacarosa                                      | 16 |
| <b>Figura 6</b>  | Representación de la estructura de las glucosiltransferasa  | 17 |
| <b>Figura 7</b>  | Representación de la inulosacarasa de <i>L. citreum</i>   | 18 |
| <b>Figura 8</b>  | Diagrama de las tres versiones truncadas de la inulosacarasa expresada en <i>E. coli</i>                              | 19 |
| <b>Figura 9</b>  | Proceso digestivo de inulina y oligosacáridos   | 21 |
| <b>Figura 10</b> | Proceso para la extracción industrial de inulina  | 22 |
| <b>Figura 11</b> | Geles de SDS-PAGE teñidos con el reactivo de Shiff  | 35 |
| <b>Figura 12</b> | Curva de crecimiento de <i>L. citreum</i>   | 36 |
| <b>Figura 13</b> | Identificación del manitol  | 38 |
| <b>Figura 14</b> | Regresión lineal mediante el método de Lineweaver-Burk.   | 39 |
| <b>Figura 15</b> | Especificidad de la reacción con diferentes concentraciones de sacarosa   | 41 |
| <b>Figura 16</b> | Análisis en HPLC de las reacciones de aceptor   | 42 |
| <b>Figura 17</b> | Diagrama de la producción de inulina en la planta piloto  | 43 |
| <b>Figura 18</b> | Distribución de pesos moleculares de la inulina commercial y la inulina producida por <i>Leuconostoc citreum</i> CW28 | 44 |
| <b>Figura 19</b> | Influencia de la concentración de sacarosa en el peso molecular de la inulina   | 45 |
| <b>Figura 20</b> | Distribución de pesos moleculares a diferentes tiempos de reacción  | 44 |

**ÍNDICE DE TABLAS**

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1</b> Contenido de inulina en plantas empleadas para consumo humano   | 6  |
| <b>Tabla 2</b> Composición del medio de cultivo de <i>Leuconostoc citreum</i> con actividad inulosacarasa                          | 24 |
| <b>Tabla 3</b> Especificidad de la enzima asociada a células provenientes de medios de cultivo con fuentes de nitrógeno diferentes | 34 |
| <b>Tabla 4</b> Constantes cinéticas para la enzima asociada a células y en solución  | 40 |

## RESUMEN

Se realizó la caracterización fisicoquímica y cinética de la inulosacarasa (IS) de *Leuconostoc citreum* CW28, una fructosiltransferasa (FTF) asociada a la pared celular que cataliza la formación de inulina, un polímero de fructosa con enlaces  $\beta$ -(2-1) a partir de la sacarosa. El estudio de la enzima se efectuó tanto en su forma asociada como solubilizada mediante un tratamiento con urea.

Al trabajar con la enzima asociada a células, se determinó que *L. citreum* CW28 produce también una manitol deshidrogenasa intracelular dependiente de NADH, que reduce la fructosa proveniente de la reacción de hidrólisis a manitol.

El análisis de las constantes cinéticas de la IS para las reacciones de transferencia e hidrólisis mostró que la IS es más eficiente para transferir el residuo fructosilo hacia el agua. Se logró dirigir la especificidad enzimática hacia la síntesis de polímero, tanto en la enzima en solución como en su forma asociada, al aumentar la concentración de sustrato.

A diferencia de otras FTFs, esta enzima transfiere el residuo fructosilo hacia el agua y a la sacarosa, y no hacia otros probables aceptores adicionados al medio de reacción.

Fueron definidas las condiciones de síntesis para la obtención de una mayor productividad de inulina y se llevó a cabo la producción del polímero en planta piloto. Estudios comparativos entre la inulina sintetizada por *Leuconostoc citreum* CW28 y la inulina comercial de origen vegetal (Raftiline®), indican una diferencia considerable en la distribución y el tamaño de pesos moleculares.

Se analizó la influencia de la forma enzimática (asociada a células y solubilizada), de la concentración de sustrato y del tiempo de reacción en la variación del peso molecular de la inulina, encontrando diferencias notables en la distribución de pesos moleculares en el polímero producido por ambas formas enzimáticas.

Los resultados obtenidos indican que es posible implementar un proceso enzimático para la obtención de la inulina.

## INTRODUCCION

Los polímeros de fructosa reciben el nombre genérico de fructanas y son sintetizadas por más de 36,000 especies de plantas (Carpita y col., 1989) y por una amplia gama de microorganismos. Entre las fructanas destacan la inulina y la levana. La inulina es un polisacárido constituido por unidades de fructosa unidas por enlaces  $\beta$ -(2-1). Dependiendo de su origen, estas cadenas pueden ser lineales o presentar ramificaciones en posición  $\beta$ -(2-6).

Entre las plantas que almacenan fructanas se encuentran cereales como el trigo y la avena, vegetales como cebolla y achicoria, plantas ornamentales y pastos para forraje (Hendry y Wallace, 1993), así como algunas especies de agave. Estos polisacáridos, además de ser una reserva de carbohidratos alternativa al almidón, también se encuentran implicados en la protección contra el déficit de agua causado por sequía y contra bajas temperaturas.

La síntesis de fructanas en plantas se efectúa por la acción concertada de dos o más FTF<sub>s</sub> (Hendry y Wallace, 1993), en tanto que en bacterias se realiza por la acción de una sola enzima. En la síntesis bacteriana de inulina interviene la enzima IS que ha sido reportada únicamente en *Streptococcus mutans* (Rosell y Birkhed, 1974), *Leuconostoc citreum* (Olivares-Illana y col., 2002), *Lactobacillus reuteri* (van Hijum y col., 2002) y *Bacillus* sp. (Wada y col., 2003). La IS cataliza la transferencia del residuo fructosilo de la sacarosa a una molécula de polisacárido en crecimiento. La energía necesaria para formar el enlace glicosilo es proporcionada por la ruptura del enlace de la sacarosa, por lo que no es necesaria la presencia de cofactores (Duboc y Mollet, 2001). La glucosa es la molécula inicial del polímero, ya que la sacarosa actúa como primer aceptor.

El grado de polimerización (GP) de la inulina varía dependiendo de su origen. Cuando las cadenas de fructosa presentan un GP de 2 a 10 unidades, reciben el nombre de fructooligosacáridos (FOS). Los FOS pueden obtenerse a partir de la extracción en plantas, por hidrólisis de la inulina (Niness, 1999), por síntesis enzimática utilizando FTF<sub>s</sub> (Tanaka y col., 1981) o por una complicada síntesis química (Oscarson y Sehgelmeble, 2002).

Debido a la configuración  $\beta$  del C-2 anomérico en sus monómeros de fructosa, la inulina y los FOS resisten la hidrólisis de las enzimas digestivas específicas para enlaces glicosídicos alfa presentes en el intestino delgado ( Roberfroid, 2002). Esta característica sitúa a la inulina como el prototipo de prebiótico. Por definición, un prebiótico es un ingrediente no digerible que beneficia al hospedero por estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de especies bacterianas (Gibson y col., 1995).

Inherente a su condición prebiótica, la inulina induce efectos fisiológico/nutricionales importantes, ya que mejora la biodisponibilidad de calcio y magnesio, debido a las altas concentraciones de ácidos grasos de cadena corta, resultantes de su fermentación en el colon (Roberfroid, 1999 a, 2000). También se ha demostrado que reduce el desarrollo de lesiones precancerosas colónicas, la hipotrigliceridemia y la hipoinsulinemia en modelos experimentales ( Roberfroid, 2002). Aunado a lo anterior, se encuentran en fase de estudio las posibles implicaciones del consumo de inulina y FOS en la reducción del riesgo de sufrir una serie de padecimientos que incluyen osteoporosis, obesidad y arterosclerosis cardiovascular entre otros.

En la industria alimentaria, la inulina se emplea como fibra dietética, sustituto de grasas, texturizante y estabilizante (Roberfroid, 2000). Por su bajo valor calórico, la inulina y los FOS son utilizados como sustitutos de azúcar en productos lácteos y postres. Los FOS son más solubles que la sacarosa y poseen aproximadamente de 30 a 50 % del dulzor de la misma (Niness, 1999). La hidrólisis y fermentación tanto de los FOS como de la inulina por la microflora colónica (principalmente bifidobacterias y lactobacilos), aporta aproximadamente 1.5 kcal/g, lo que representa el 38 % del valor aportado por una molécula de hexosa digerida (Roberfroid, 1999 b).

Es importante señalar que la inulina disponible actualmente a nivel comercial se extrae principalmente de la raíz de achicoria (*Cichorium intybus*), aunque también se usa la alcachofa de Jerusalem (*Helianthus tuberosus*) y podría incluirse al *agave azul tequilana*.

En el grupo de Biocatálisis del Instituto de Biotecnología, se aisló la cepa CW28 de *Leuconostoc citreum* que presenta actividad FTF específica hacia la síntesis de inulina

(Olivares-Illana y col., 2002). Posteriormente se realizó el aislamiento del gen y la expresión heteróloga en *Escherichia coli* con vías a la producción de inulina (Olivares-Illana y col., 2003).

En este trabajo reportamos la caracterización cinética y bioquímica de la IS de *Leuconostoc citreum* CW28, así como la identificación de los productos de reacción. Debido al interés creciente hacia este tipo de polímeros, y especialmente hacia la inulina, estudiamos las condiciones de reacción en que puede llevarse a cabo la síntesis enzimática del polisacárido como una alternativa a su extracción de fuentes vegetales.

Hasta la fecha no existe ninguna propuesta de producción microbiana o enzimática de este importante prebiótico.

# 1 GENERALIDADES

## 1.1 Fructosiltransferasas

Las FTF<sub>s</sub> son enzimas que catalizan la transferencia de un residuo fructosilo desde la sacarosa o la rafinosa hacia un polisacárido en crecimiento, dando lugar a diferentes polímeros que reciben el nombre de fructanas. El residuo de fructosa puede ser transferido también hacia otras moléculas que actúan comoceptoras. Entre estas últimas se encuentran el agua (hidrólisis de la sacarosa), la sacarosa, diversos alcoholes, monosacáridos y oligosacáridos (Chambert y col, 1974). Estas reacciones se esquematizan en la figura 1, ejemplificando con la maltosa las reacciones deceptor.

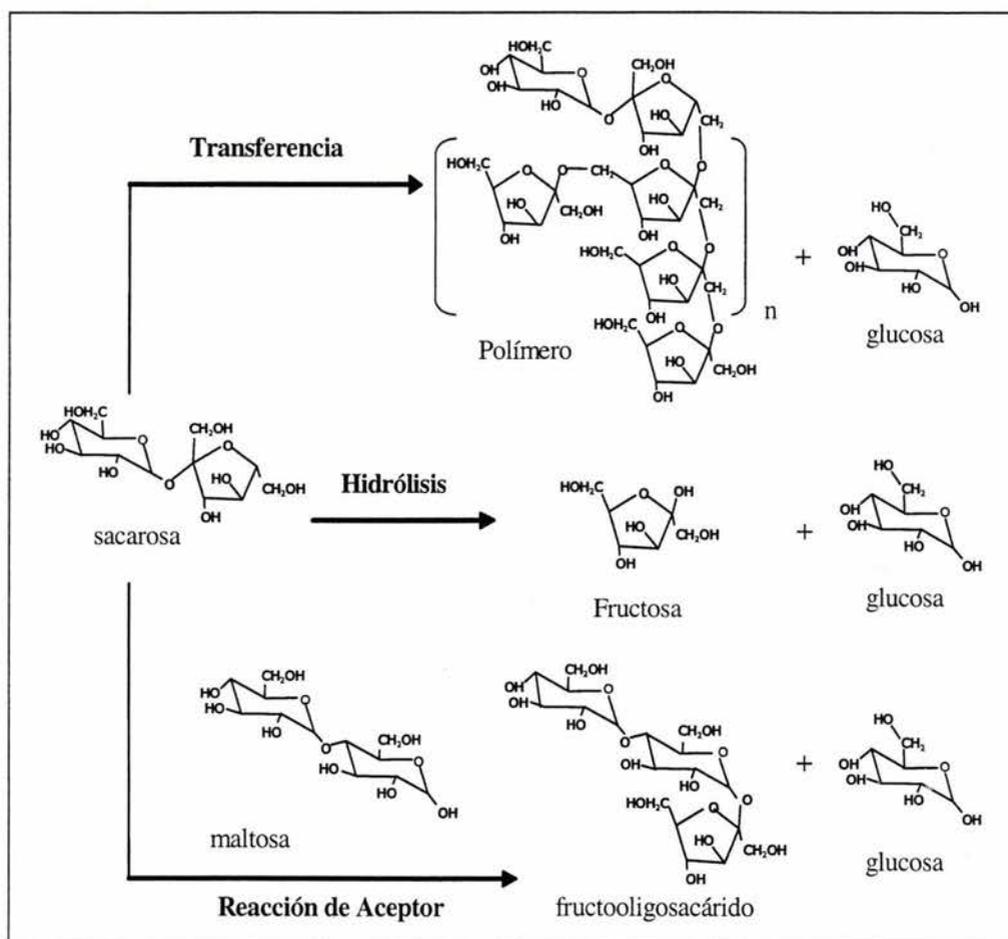


Figura 1. Reacciones catalizadas por las fructosiltransferasas.

La energía del enlace glucosídico de la sacarosa hace posible la transferencia eficiente de un residuo D- fructosilo vía la formación de un intermediario covalente fructosil-enzima (Monsan y col, 2001), por lo que no es necesaria la presencia de cofactores para la formación del polímero. Las fructanas son sintetizadas por aproximadamente el 15 % de las especies de plantas que producen flores, así como por hongos y bacterias.

### 1.1.1. Fructosiltransferasas de plantas

Como el almidón, las fructanas se encuentran presentes en las plantas como reserva de carbohidratos.

**Tabla 1.** Contenido de inulina en plantas empleadas para consumo humano (van Loo y col, 1995). \* Valor estimado.

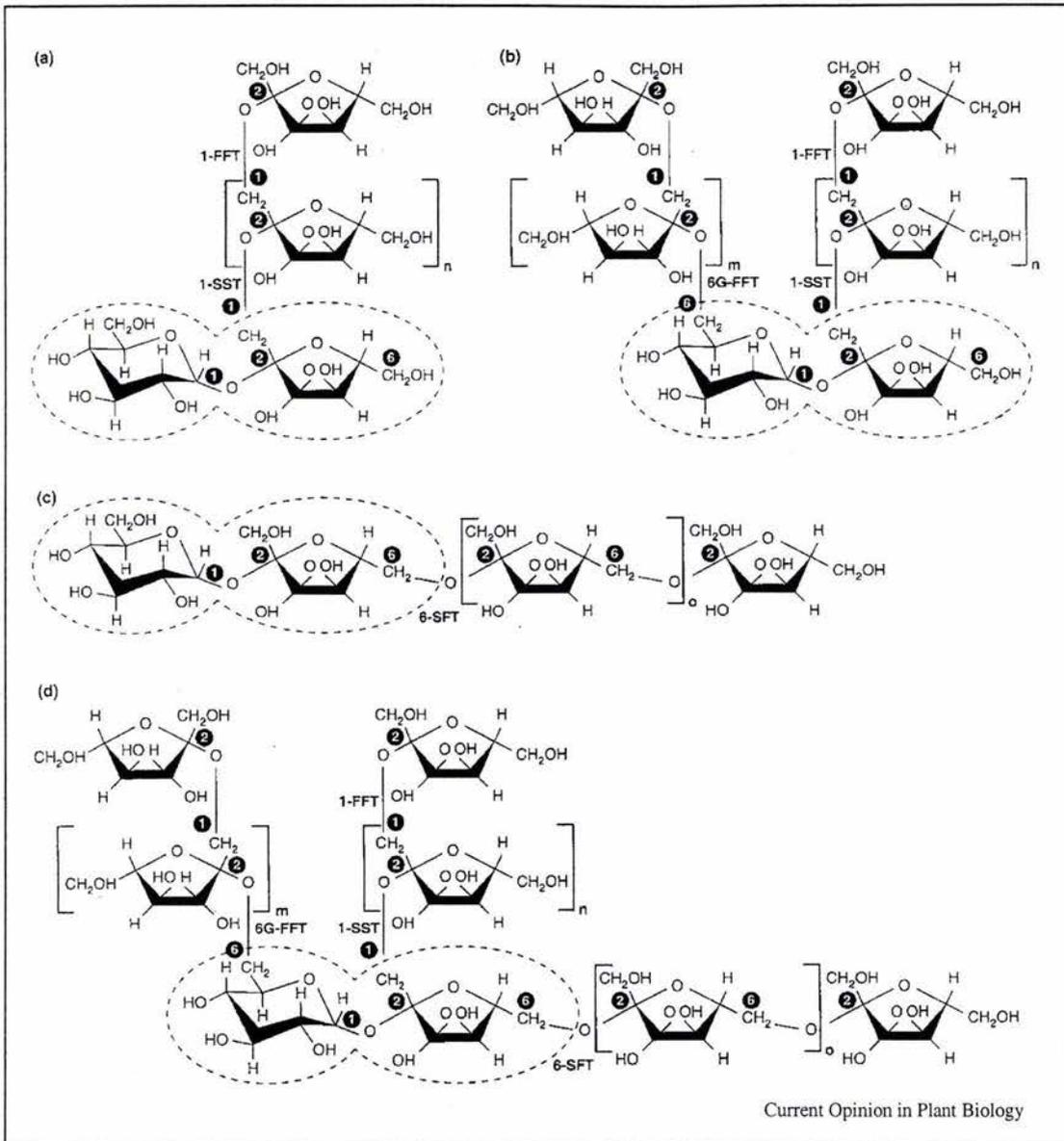
| <b>Fuente</b>             | <b>Parte comestible</b> | <b>Contenido de inulina<br/>(% de peso fresco)</b> |
|---------------------------|-------------------------|--|
| Cebolla                   | Bulbo                   | 2-6  |
| Alcachofa de<br>Jerusalem | Tubérculo               | 14-19  |
| Achicoria                 | Raíz                    | 15-20  |
| Puerro                    | Bulbo                   | 3-10   |
| Ajo                       | Bulbo                   | 9-16   |
| Alcachofa                 | Hojas y corazón         | 3-10   |
| Plátano                   | Fruto                   | 0.3-0.7  |
| Centeno                   | Cereal                  | 0.5-1*   |
| Cebada                    | Cereal                  | 0.5-1.5*   |
| Diente de león            | Hojas                   | 12-15  |

A diferencia del almidón que se almacena en los plastidios, las fructanas son sintetizadas y almacenadas en las vacuolas. Algunas especies vegetales las almacenan en órganos especializados, por ejemplo, la raíz de la achicoria (*Cichorium intybus*), los tubérculos de la dalia (*Dahlia variabilis*), y los bulbos del tulipán (*Tulipa gesneriana*) y de la cebolla (*Allium cepa*).

El almacenamiento de estos polímeros es inducido por altas concentraciones de sacarosa, mientras que la degradación ocurre durante procesos como la defoliación (Ritsema y Smeekens, 2003). Además, las fructanas aumentan la resistencia de las plantas al frío y a la desecación. En la tabla 1 se reporta el contenido de inulina de diversos vegetales (van Loo y col, 1995).

Los polisacáridos de origen vegetal presentan estructuras y GPs diferentes que pueden ir desde 3 unidades de fructosa hasta más de 200. En la figura 2 se puede observar la diversidad estructural de las fructanas y del tipo de enlaces de acuerdo con la enzima responsable. De acuerdo a lo anterior, las fructanas se clasifican de la siguiente manera:

- (a) **Inulina.** Está constituida por residuos fructosilo unidos mediante enlaces  $\beta(2-1)$  en forma lineal. Generalmente se encuentra en especies pertenecientes al orden Asterales, como la achicoria y la alcachofa de Jerusalem. La molécula más pequeña de inulina es el trisacárido 1-kestosa (Vijn y Smeekens, 1999).
- (b) **Neoseries de inulina.** Presentan dos cadenas lineales de fructosa de diversos tamaños unidas mediante enlaces  $\beta(2-1)$ , una unida a la glucosa y otra a la fructosa de la molécula de sacarosa inicial (Ritsema y Smeekens, 2003). Se les encuentra en plantas pertenecientes a las Liliaceae, como cebolla y aspárragos.
- (c) **Levana.** Las levanas de plantas también reciben el nombre de phleinas. Están formadas por unidades de fructosa unidas por enlaces  $\beta(2-6)$  y se encuentra en algunas plantas del orden Poaceae (Vijn y Smeekens, 1999).
- (d) **Fructanas “mezcladas”.** Son polímeros ramificados en los cuales los residuos fructosilo se unen mediante enlaces  $\beta(2-1)$  y  $\beta(2-6)$ . Además, puede haber una cadena de fructosa unida al residuo glucosilo.



Current Opinion in Plant Biology

**Figura 2 .** Ejemplo de diferentes tipos de fructanas. La sacarosa se encuentra señalada en círculos y se muestra la enzima formadora de cada tipo de enlace. Las fructanas esquematizadas son: a) inulina; b) neo-series de inulina; c) levana; d) fructanas "mezcladas".

De acuerdo al modelo de Edelman y Jefford (1968), la síntesis de este tipo de polímeros inicia con la conversión de la sacarosa a 1-kestosa por medio de la enzima sacarosa:sacarosa 1- fructosiltransferasa (1-SST, EC 2.4.1.99). Posteriormente, la enzima fructana:fructana 1- fructosiltransferasa (1-FFT, EC 2.4.1.100) usa como donadores de fructosa a la 1- kestosa o a cadenas de fructanas con un grado de polimerización mayor y

puede realizar la transferencia de este residuo hacia la sacarosa o a una gran variedad de fructanas que actúan como moléculasceptoras (Figura 2a).

En la formación de fructanas más complejas actúa otro tipo de enzimas. Para la síntesis de neo-series de inulina (Figura 2b) se requiere de la enzima fructana: fructana 6G-fructosiltransferasa (6G-FFT), que produce el trisacárido neokestosa. Este trisacárido tiene una segunda unidad fructosilo unida al C6 del residuo de glucosa de la sacarosa inicial. La enzima 6G-FFT usa la 1-kestosa (formada por acción de la 1-SST) como donador de fructosa y transfiere el grupo fructosilo al residuo de glucosa de la sacarosa a través de un enlace  $\beta(2-6)$ , dando lugar a la formación de neokestosa. Este trisacárido puede ser elongado mediante enlaces  $\beta(2-1)$  en ambos residuos de fructosa (Vijn y Smeekens, 1999), siendo probable que en esta reacción también esté involucrada la enzima 6G-FFT (Ritsema y Smeekens, 2003).

En la formación de la bifurcosa, un tetrasacárido con un enlace adicional  $\beta(2-6)$  que introduce una ramificación, interviene la enzima sacarosa:fructana 6-fructosiltransferasa (6-SFT, EC 2.4.1.10). Esta enzima utiliza como sustrato a la 1-kestosa. La enzima 6-SFT puede sintetizar también 6-kestosa y se encuentra involucrada en la formación de levana (figura 2c).

Al parecer, la síntesis de fructanas complejas como las “mezcladas” (figura 2d) se realiza por la acción combinada de las enzimas 1-SST, 1-FFT, 6-SFT y 6G-FFT (Ritsema y Smeekens, 2003).

### 1.1.2 Fructosiltransferasas de hongos

Se han identificado varias cepas de hongos que sintetizan fructanas de una amplia gama de pesos moleculares.

Hirayama y col. (1989), reportaron la producción de FOS por *Aspergillus niger*. La síntesis de FOS también fue observada en *Fusarium oxysporum* (Patel y col. 1997). Rehm y col (1998), realizaron la expresión heteróloga de la enzima 1-SST, una FTF de *Aspergillus foetidus*. Finalmente, se demostró que *Penicillium chrysogenum* (Olah y col,

1993) y *Aspergillus sydowii* (Kawai y col, 1973; Harada y col, 1994) sintetizan inulina de alto peso molecular.

Al modificar las condiciones experimentales, la FTF de *Aspergillus sydowii* sintetiza productos de diferentes pesos moleculares. Cuando los conidios fungales son suspendidos, se obtiene inulina con un peso molecular de más de 10 millones (Kawai y col, 1973; Harada y col, 1994). El micelio liofilizado y posteriormente rehidratado produce una mezcla de oligosacáridos con un grado de polimerización de 3 a 13 (Muramatzu y Nakakuki, 1995).

Heyer y Wendenburg (2001), lograron la expresión heteróloga de la FTF de *Aspergillus sydowii* en *S. cerevisiae*, *E. coli* y en plantas de papa. Sus resultados respecto al peso molecular coinciden con los de Muramatzu y col (1995), ya que al incubar extractos proteicos de conidios de *A. sydowii*, así como extractos proteicos de la FTF expresada en *S. cerevisiae* y en *E. coli*, solo observaron la producción de FOS. Sin embargo, los productos de la síntesis in vivo con conidios fungales fueron de pesos moleculares mayores a  $1 \times 10^7$  Da. Por otra parte, la síntesis de fructanas en plantas transgénicas dio como resultado moléculas de inulina de aproximadamente 40 unidades de hexosa. Una explicación de los autores sobre esta diferencia en pesos moleculares es la presencia en los conidios de un factor adicional necesario para la síntesis de inulina de peso molecular elevado, ya que el gen que codifica para esta FTF no se expresa en micelio. Dicho factor podría haberse perdido o inactivado durante la extracción proteica.

Cuando la FTF de *A. sydowii* fue expresada en plantas de papa se observó un fuerte fenotipo de retraso en el crecimiento, necrosis de las hojas y finalmente la muerte en pocas semanas. Este fenotipo coincide en plantas que expresan levansacarasas (LS<sub>s</sub>) bacterianas, ya que estas enzimas muestran baja especificidad hacia moléculasceptoras del residuo fructosilo. Lo anterior permite que ésta molécula sea transferida a una variedad de compuestos que contienen grupos hidroxilo. El hecho de que la actividad LS pueda interferir con la glicosilación proteica en otros procesos celulares es la causa probable del daño celular en plantas transgénicas.

### 1.1.3 Fructosiltransferasas de bacterias

Entre las bacterias Gram-positivas que producen FTF<sub>s</sub>, específicamente LS<sub>s</sub>, se ha reportado diferentes especies de *Bacillus*, como *B. subtilis*, *B. circulans*, *B. polymyxa* y *B. amyloliquefaciens*, además de *Rahnella aquatilis* y *Lactobacillus reuteri*. Entre las especies de Gram-negativos se encuentran *Zymomonas mobilis*, *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, *P. syringae* pv. *phaseolicola* y *Acetobacter diazotrophicus* (Olivares-Illana y col, 2002).

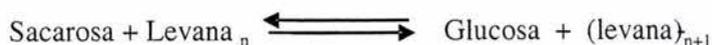
Las inulosacarasas han sido aisladas de plantas, hongos y, como se mencionó con anterioridad, de cuatro géneros bacterianos: *Streptococcus mutans* (Shiroza y Karamitzu, 1988), *Lactobacillus reuteri* (van Hijum y col, 2002), *Leuconostoc citreum* (Olivares-Illana y col., 2002) y *Bacillus* sp (Wada y col., 2003).

#### 1.1.3.1 Mecanismo de reacción

Las FTF<sub>s</sub> son enzimas capaces de realizar varias reacciones en presencia de sacarosa, por lo que ha sido complicado elucidar el mecanismo de reacción mediante el cual efectúan la síntesis de polímero. La enzima más estudiada incluido este aspecto es la LS de *Bacillus subtilis*. Chambert y col. (1974), reportaron que esta enzima cataliza principalmente la siguiente reacción:



Entre los compuestos que pueden actuar como aceptores se encuentran algunos alcoholes, monosacáridos, sacarosa, oligosacáridos, levanas y el agua. En presencia exclusivamente de sacarosa se generan fructosa libre, levana y glucosa. Cuando son adicionadas al medio de reacción levanas pequeñas, la velocidad de transfructosilación aumenta y se incrementa la relación de levana formada a la de fructosa libre, es decir, disminuye la transferencia de fructosa al agua con relación a la reacción de hidrólisis. En presencia de levana se demostró la reversibilidad de la reacción de transfructosilación:



La LS también mostró actividad hidrolítica de levanas pequeñas y de la sacarosa, además de catalizar la reacción de intercambio del residuo glucosilo de la sacarosa por la glucosa libre.

Para establecer el mecanismo de reacción de la LS, Chambert y col. (1974), agregaron levana al medio de reacción para eliminar la reacción de hidrólisis y simplificar el modelo. Las constantes cinéticas para el mismo se obtuvieron midiendo velocidades iniciales de las diferentes reacciones y suponiendo condiciones de estado estacionario.

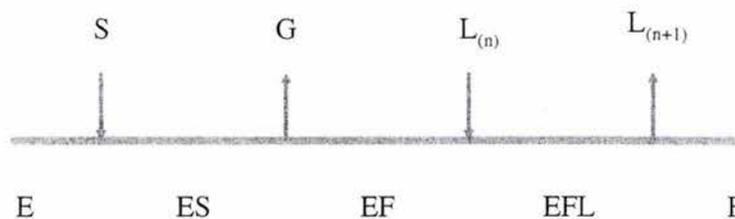
Un aspecto importante en la determinación de las expresiones cinéticas fue el mecanismo de elongación de la cadena, ya que se ha propuesto tres mecanismos diferentes para tal efecto:

- (a) **Crecimiento de una cadena.** Los residuos fructosilo se agregan de forma sucesiva a una sola molécula aceptora, hasta que concluye su síntesis.
- (b) **Crecimiento múltiple.** Los residuos de fructosa se adicionan uno a uno a las moléculasceptoras, liberándolas al medio después de cada adición.
- (c) **Crecimiento multirepetitivo.** Los residuos fructosilo se agregan en grupos de más de uno a la molécula aceptora.

El peso molecular de la levana fue analizado antes y después de la reacción, ya que se adicionó al medio como molécula aceptora. Se encontró que el peso molecular es prácticamente el mismo, por lo que al hacer la comparación del peso molecular teórico que se alcanzaría en cada uno de los modelos propuestos con el obtenido, se concluyó que la síntesis del polímero se realiza mediante el crecimiento múltiple. Lo anterior permitió simplificar las ecuaciones de velocidad inicial al considerar que la molécula de levana-sustrato es la misma que la de levana-producto.

Mediante el análisis de los datos obtenidos, estos autores concluyen que el comportamiento enzimático se ajusta a un modelo de Ping-Pong Bi-Bi (Fig 3). De acuerdo con dicho mecanismo, la enzima forma un complejo enzima-sustrato que

posteriormente da lugar a un intermediario covalente enzima-fructosilo (EF) al liberar a la glucosa. Finalmente, el residuo fructosilo es transferido a la molécula aceptora (levana), aumentando de esta forma el grado de polimerización de la misma.



**Fig. 3.** Mecanismo de Ping-Pong Bi-Bi (notación de Cleland) propuesto para la levansacarasa. E- enzima; S- sacarosa; G- glucosa;  $L_n$ - levana con n residuos de fructosa.

Chambert y Gonzy-Treboul (1976) aislaron y caracterizaron el complejo EF, proponiendo un mecanismo molecular para la reacción de transfructosilación. Estos autores proponen que dicho residuo se encuentra covalentemente unido a la enzima a través de un enlace glicosilo-éster, lo que implica la participación del grupo  $\beta$ -carboxilo de un residuo aspártico de la proteína y el carbono 2 de la fructosa. La fructosa y la enzima podrían estar unidos mediante un enlace  $\alpha$ . Tomando en cuenta que las  $LS_s$  catalizan la reacción de transfructosilación con retención de la configuración, se propone un mecanismo de doble desplazamiento, en el que hay una inversión transitoria de la configuración de la fructosa en el complejo EF.

Para la formación del intermediario, hay un ataque nucleofílico del grupo  $\beta$ -carboxilato de un residuo aspártico sobre el carbono 2 de la fructosa, seguido de la transferencia de un protón de un grupo ácido hacia el grupo saliente (la glucosa). La reacción anterior da lugar a la unión  $\alpha$  de la fructosa con la proteína. Al entrar la molécula aceptora, el grupo ácido desprotonado remueve un protón de la misma, dando lugar a un anion altamente reactivo que realiza finalmente un ataque nucleofílico sobre el enlace éster del complejo EF.

### 1.1.3.2 Estructura

Se ha observado que las estructuras tridimensionales y los residuos involucrados en la catálisis se encuentran más conservados que las secuencias de aminoácidos, por lo que ambos, la comparación de secuencias y los estudios estructurales, han sido las herramientas empleadas para agrupar a muchas glicosil-hidrolasas de acuerdo a un plegamiento y a un aparato catalítico común (Henrissat y Davies, 1997)

Las  $\beta$ -fructofuranosidasas han sido agrupadas en la familia 32 de las glicosil-hidrolasas que incluye a las invertasas, levanasas, inulinasas, sacarosa-6-fosfato hidrolasas, y FTF<sub>s</sub> de hongos y plantas. Se les asocia también en la familia 68 de las glicosil-hidrolasas que reúne a las FTF<sub>s</sub> de bacterias y a las invertasas de *Zymomonas mobilis* y *Bacillus sp.*

La estructura cristalográfica de las FTF<sub>s</sub> no había sido completamente esclarecida, ya que solo se contaba con la estructura de la LS de *Bacillus subtilis* obtenida a 3.8 Å de resolución (Le Brun y van Rapenbusch, 1980), lo cual no proporcionaba la información suficiente sobre el sitio activo. Para obtener información al respecto, se había recurrido a estudios de predicción de estructura de FTF<sub>s</sub> de diferentes orígenes.

Pons y col. (2000) realizaron un análisis de predicción de estructura para diferentes glucosiltransferasas, localizando la región conservada llamada “caja de sacarosa” en LS<sub>s</sub> y en las enzimas de la familia 32 de las glicosil-hidrolasas. Otra caja conservada, el motivo RDP (Arg-Asp-Pro) se ubicó en FTF<sub>s</sub> de bacterias, plantas y hongos. Finalmente, estos autores concluyen que las FTF<sub>s</sub>, independientemente de su origen, comparten una estructura tipo  $\beta$ -propela, lo cual relaciona a estas enzimas con las estructuras tridimensionales conocidas de la neuraminidasa y la sialidasa, pertenecientes a las familias de las glicosil-hidrolasas de las familias 33 y 34 respectivamente.

Recientemente se logró la cristalización de la LS de *Bacillus subtilis* (Meng y Fütterer, 2003) con y sin sustrato, a una resolución de 1.5 y 2.1 Å respectivamente. Estos autores reportaron que la estructura secundaria basada en la superposición de la LS con la  $\alpha$ -L-arabinanasa A43 de *Cellvibrio japonicus* (Arb43A), indica una relación cercana

entre la familia 68 y la 43 de las glicosil-hidrolasas. Se plantea que lo anterior, asociado a que dichas familias mostraron regiones conservadas, sugiere que provienen de un ancestro común.

Meng y Fütterer (2003), reportan que el dominio sencillo de la LS exhibe el plegamiento de una  $\beta$ -propela de 5 hojas con la topología clásica de “W”, formada por cuatro hebras  $\beta$  antiparalelas (figura 4). Esta estructura encierra una cavidad central “a manera de embudo”. La estructura  $\beta$ -propela formada por cinco hojas había sido reportada en dos proteínas: en la taquilectina-2 (Meng y Fütterer, 2003) y en Arb43A (Nurizzo y col., 2002).

De la estructura cristalográfica se desprende que la LS de *Bacillus subtilis* no exhibe el “velcro molecular” típico de las  $\beta$ -propelas; es decir, la estructura no se cierra por la unión de ambos extremos en la misma hoja  $\beta$ . En la figura 4 puede observarse que el extremo N-terminal se localiza diametralmente a través de la primera hoja  $\beta$ , en tanto que el C-terminal se empaca contra la hoja V.

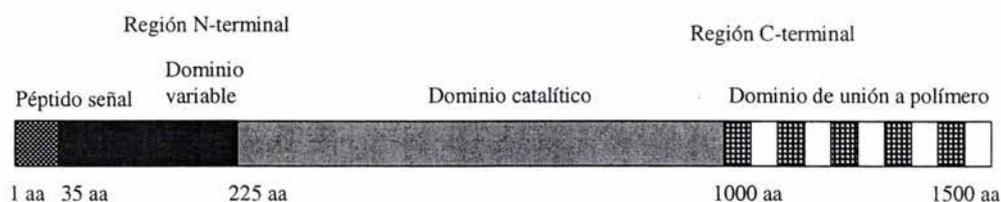
La explicación de los autores a la ausencia del velcro molecular radica en que la LS es una enzima extracelular, por lo que necesita desplegarse parcialmente para ser exportada. Dicho mecanismo implica la liberación del N-terminal que permita la estabilización reversible de la  $\beta$ -propela.

Respecto al sitio activo, el complejo estructural enzima-sacarosa les permitió ubicar a los probables residuos involucrados en el mecanismo molecular de reacción propuesto por Chambert y Gonzy-Treboul (1976).

La estructura cristalográfica sugiere que el aspártico 86 y el glutámico 342 son los residuos involucrados en el mecanismo catalítico que conlleva al rompimiento del enlace glicosídico de la sacarosa. Respecto al otro residuo aspártico (Asp247) que se encuentra cercano al sitio activo, se concluye que aun cuando interviene en la catálisis no se encuentra relacionado con el mecanismo químico de la reacción.



Estructuralmente, estas enzimas no presentan dominios, a diferencia de las glucosiltransferasas ( $GTF_s$ ), enzimas análogas en su función con las  $FTF_s$ , ya que catalizan la transferencia de glucosa a una cadena creciente de polisacárido, dando lugar a polímeros conocidos como dextranas. Las  $GTF_s$  catalizan también la reacción de transferencia del residuo glucosilo hacia varios aceptores. En función del origen de estas enzimas, las dextranas pueden tener diversas estructuras. Las  $GTF_s$  presentan tres dominios: el dominio amino está formado por una región variable con función desconocida y contiene al péptido señal; el dominio catalítico y finalmente se encuentra el dominio C-terminal que está involucrado en la unión del glucano sintetizado (Figura 6).

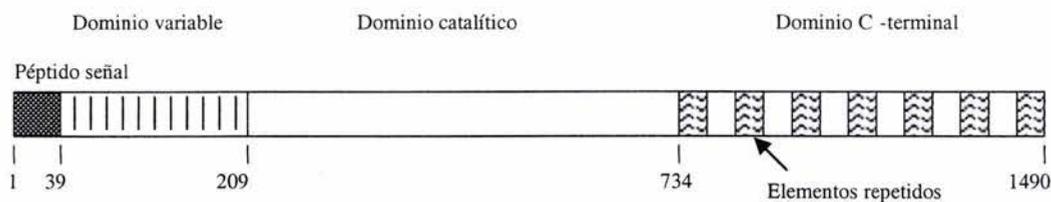


**Figura 6.** Representación de la estructura de las glucosiltransferasas.

Otra diferencia considerable entre las  $GTF_s$  y las  $FTF_s$  radica en sus pesos moleculares, ya que el tamaño de las  $GTF_s$  varía de 155 a 200 kDa (Olivares-Illana y col., 2003), en tanto que las  $FTF_s$  presentan pesos más pequeños, generalmente entre 50 y 80 kDa, con excepción de la de *S. salivarius* para la que se reporta un PM de 140 kDa.

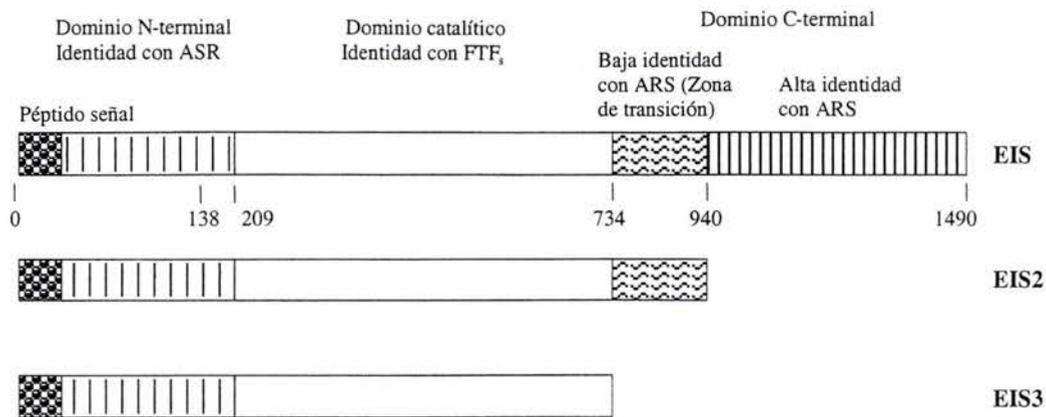
Olivares-Illana y col., (2003) reportaron la identificación de una  $FTF$ , específicamente de una IS de *Leuconostoc citreum*, describiéndola como una enzima quimérica, ya que presenta tres dominios. El primer dominio en el extremo N-terminal presentó una alta identidad (40 %) con la alternansacarasa (ASR), una  $GTF$  de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 que produce al polímero alternana. Este dominio incluye una región variable que no se encuentra conservada entre  $GTF_s$ . El segundo es un dominio catalítico similar en  $IS_s$  y  $LS_s$  de diferentes microorganismos, que permite relacionar a esta IS con la familia 68 de las glicosil-hidrolasas. En los alineamientos realizados con  $FTF_s$  de organismos Gram-positivos se encontraron ocho

motivos conservados que fueron ubicados también en esta enzima. En el análisis de la región C-terminal se encontró una identidad del 80 % con la de ASR<sub>s</sub>. Este dominio se ha identificado como de unión a polímero en las GTF<sub>s</sub>. Además, se encontró un grupo de siete elementos repetidos que sólo están presentes en la ASR (Fig. 7). Por las características de esta enzima, los autores proponen que se trata de una ASR en la que el dominio catalítico fue reemplazado por una FTF, o bien plantean la posibilidad de que una FTF se adicionó de manera natural las regiones N- terminal y C-terminal de la ASR. Independientemente del evento sucedido, el análisis de la estructura explica el peso molecular de la enzima, el cual corresponde a 165 kDa, el más alto reportado para una FTF.



**Figura 7.** Representación de la inulosacarasa de *L. citreum*.

Para tratar de explicar la función del C-terminal, Olivares- Illana y col. (2003), realizaron deleciones de este dominio en la IS expresada en *E. coli*. En una de las construcciones deletaron la región del C-terminal con alta identidad con la ARS (EIS2) y en la otra eliminaron también la región de transición. La forma esquematizada de las diferentes versiones de la IS se muestra en la figura 8. Al realizar la caracterización de las tres enzimas encontraron que su vida media disminuye a medida que se deletan fragmentos, y que la actividad hidrolítica aumenta en este mismo sentido. Con base en estos resultados, los autores concluyen que los dominios adicionales incrementan la estabilidad de la enzima, reduciendo la actividad hidrolítica de la sacarosa y favoreciendo por lo tanto la síntesis de polímero al limitar el acceso de las moléculas de agua al sitio catalítico. Sin embargo, no descartan la posibilidad de que las FTF<sub>s</sub> puedan recombinar para adquirir algunas propiedades como la de unión al polímero sintetizado.



**Figura 8.** Diagrama de las tres versiones de la inulosacarasa expresada en *E. coli*. EIS (Forma completa; 165 k Da); EIS2 (102 kDa) y EIS3 (80 kDa).

#### 1.1.4 Inulina, oligosacáridos y levana

El término inulina se ha empleado para designar a los polímeros de fructosa que, como se mencionó anteriormente, presentan enlaces  $\beta(2-1)$  y en algunos casos ramificaciones  $\beta(2-6)$ . En este término no se hace una distinción entre los compuestos  $GF_n$  o  $F_m$ , donde  $n$  y  $m$  indican el número de unidades de fructosa unidas,  $G$  es la glucosa de la sacarosa y  $F$  es fructosa.

Como se mencionó con anterioridad, la inulina de plantas generalmente alcanza un GP menor de 200, mientras que el de bacterias alcanza varios miles. El grado de polimerización de la inulina no solo varía dependiendo del origen de la misma, sino que también se ve influenciado en el caso de especies vegetales por la edad de las mismas y las condiciones climáticas.

Los posibles efectos benéficos en la salud, resultado del consumo de inulina y FOS han sido estudiados desde hace más de una década tanto en animales como en humanos, a raíz de su ubicación dentro de las sustancias conocidas como prebióticos. En la figura 9 se muestra el proceso digestivo de la inulina y de los FOS. De acuerdo a

Kolida y col.( 2002), los criterios para que una sustancia sea clasificada como prebiótico son los siguientes :

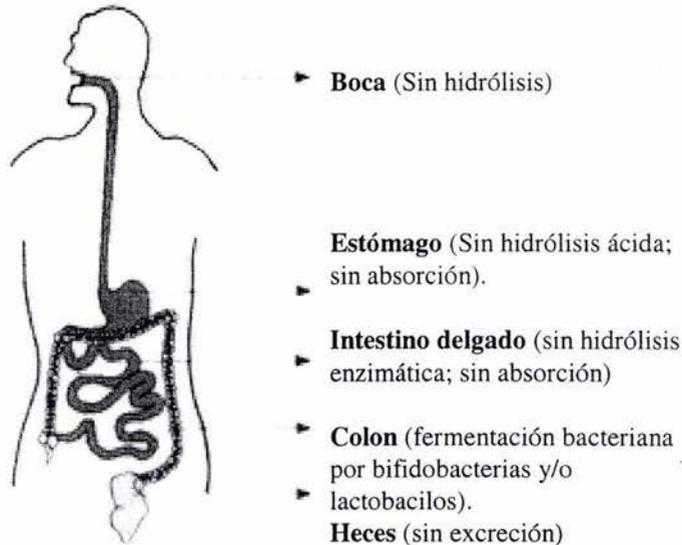
- a) No debe ser hidrolizado ni absorbido en la parte superior del tracto gastrointestinal.
- b) Debe ser fermentado de manera selectiva por uno o un número limitado de bacterias colónicas potencialmente benéficas.
- c) Debe ser capaz de alterar la microflora colónica hacia una composición más saludable, por ejemplo, incrementando el número de especies sacarolíticas y reduciendo la población de patógenos.

El efecto bifidogénico de la inulina y de los oligosacáridos ha sido estudiado ampliamente. Kruse y col. (1999), reportan un incremento en la población de bifidobacterias al reemplazar la grasa por inulina en una dieta occidental típica (45% de energía proveniente de grasas y 40 % de carbohidratos). Por otra parte, Gibson y col. (1995), observaron este mismo efecto en estudios con humanos empleando dosis de 5 a 20 g/día durante 15 días. Estos autores encontraron que un suplemento de oligosacáridos en la dieta se veía reflejado en la disminución de bacteroides, clostridia y fusobacteria, en tanto que en el caso de la inulina se observó un decremento en la población de Gram-positivos.

Aunado a su efecto bifidogénico, se ha demostrado una influencia directa tanto de la inulina como de los FOS sobre la absorción de minerales. El aumento particularmente en la absorción de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  puede deberse a un efecto osmótico, mediante el cual se transfiere agua al intestino grueso, incrementando el volumen de fluido en el que pueden disolverse los minerales. Además, al ser fermentados extensivamente, este tipo de carbohidratos acidifican el contenido colónico y por lo tanto aumentan la concentración de minerales ionizados (Roberfroid, 2000).

La influencia de la inulina en la supresión de diarrea, especialmente causada por infecciones intestinales, es otro aspecto que continúa en estudio, así como el efecto del consumo de inulina en la reducción del riesgo de sufrir osteoporosis, aterosclerosis

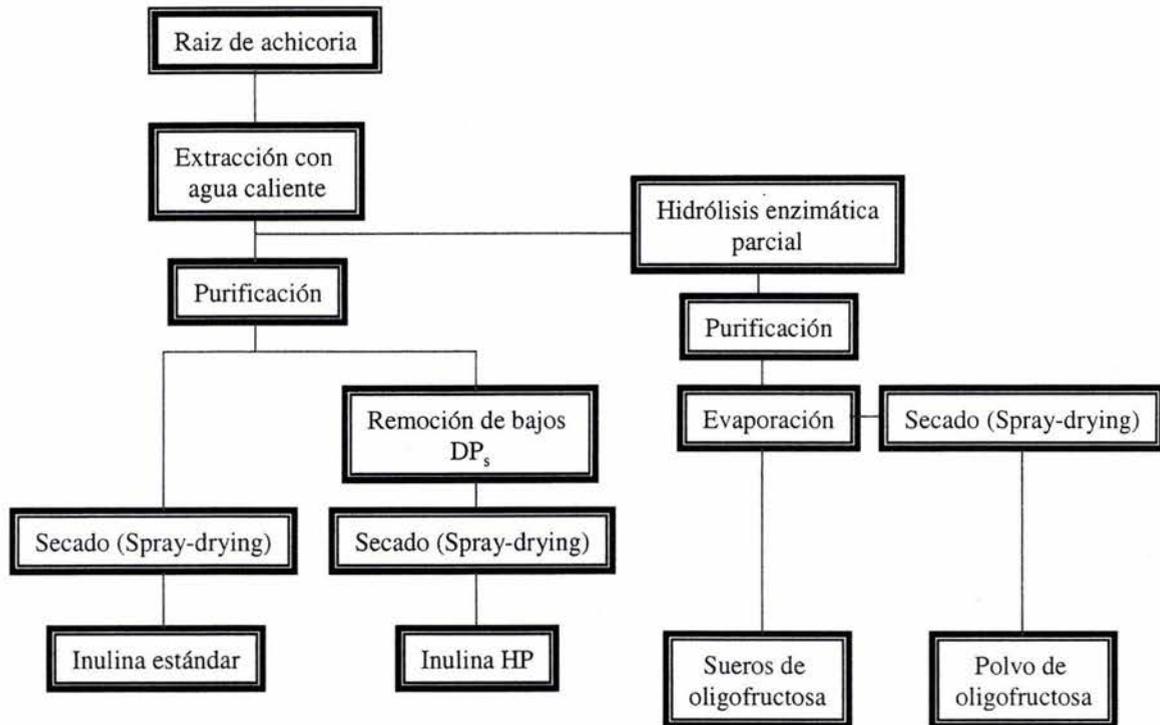
cardiovascular, obesidad y diabetes tipo 2. Diversos autores reportan un efecto inhibitorio de la inulina sobre el número de crypt foci aberrantes (lesiones preneoplásicas) en el colon (Rao y col.,1998; Reddy, 1998).



**Figura 9.** Proceso digestivo de inulina y oligosacáridos (Kolida y col, 2002).

El efecto prebiótico de la levana no ha sido estudiado tan ampliamente como el de la inulina y los FOS, sin embargo, un estudio realizado por Probert y Gibson (2002) muestra que este polímero tiene escaso efecto bifidogénico y que de hecho aumenta la población de bacteroides, así como la producción de gases.

En la producción a gran escala de inulina, la industria alimentaria puede utilizar especies diversas de plantas, dentro de las cuales la más utilizada es la achicoria (*Cichorium intybus*) por su alto contenido de inulina que es casi constante de año en año para una región determinada (Carabin y Flamm, 1999). La variedad de achicoria utilizada industrialmente es la misma que se emplea como sustituto de café. El proceso para la extracción de inulina y FOS por una de las marcas comerciales (ORAFIT), se describe en la figura 10.



**Figura 10.** Proceso para la extracción industrial de inulina y producción de FOS (Franck, 2002).

De acuerdo a Franck (2002), la inulina estándar es ligeramente dulce (aproximadamente 10 % del dulzor de la sacarosa), no así la inulina HP (high performance). Esta última es moderadamente soluble en agua (máximo 10% a temperatura ambiente), y forma una red en soluciones acuosas dando lugar a una consistencia cremosa, que permite su aplicación como sustituto de grasa en algunos alimentos.

Dada la importancia de la inulina no sólo como prebiótico sino también como aditivo en una gran variedad de productos alimenticios, cabe señalar que aún cuando se cuenta con un proceso industrial para su producción por extracción de diversas fuentes vegetales, resulta atractivo implementar un proceso de producción enzimático altamente eficiente como alternativa al proceso extractivo actual.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Caracterizar fisicoquímica y cinéticamente la inulosacarasa de *Leuconostoc citreum* como parte del diseño de un proceso enzimático para la síntesis de inulina.

### Objetivos particulares

- ◆ Estudiar la influencia de la concentración de sacarosa en la actividad de la inulosacarasa, en particular la especificidad hacia las reacciones de síntesis e hidrólisis.
- ◆ Analizar la viabilidad de realizar la síntesis de inulina con células completas o extractos enzimáticos.
- ◆ Estudiar el efecto de la concentración de sacarosa, del tiempo y de la forma enzimática (la enzima asociada a células o solubilizada) en la variación del peso molecular de la inulina obtenida durante la reacción.
- ◆ Estudiar la capacidad de la enzima para llevar a cabo reacciones de aceptor.
- ◆ Determinar la estructura de los productos obtenidos de las reacciones de aceptor.
- ◆ Definir condiciones que permitan obtener una productividad adecuada de inulina en el proceso enzimático.
- ◆ Realizar la producción de inulina a nivel de planta piloto.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Condiciones de crecimiento y medio de cultivo

Las condiciones para el crecimiento de *Leuconostoc citreum* fueron de 20 °C y 200 rpm en un medio de cultivo con sacarosa como fuente de carbono (Tabla 2). El pH del medio al inicio de la fermentación fue ajustado a 6.9. La selección de esta temperatura para el proceso se justifica al inicio de la sección de resultados.

**Tabla 2.** Composición del medio de cultivo de *Leuconostoc citreum* con actividad inulosacarasa.

| Componente                             | Concentración (g/L) |
|--|---------------------|
| Sacarosa                               | 20                  |
| Extracto de levadura                   | 20                  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>        | 20                  |
| MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O | 0.2                 |
| CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O | 0.05                |
| FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O  | 0.01                |
| MnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O | 0.01                |
| NaCl                                   | 0.01                |

### 2.2 Curva de crecimiento de *Leuconostoc citreum*

Para la obtención del inóculo, se partió de la cepa almacenada en glicerol a -20 °C. Se realizaron cultivos en matraces de 250 mL con 100 mL de medio estéril, los cuales fueron incubados a 20 °C y 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 5. Para medir la densidad óptica, las alícuotas del cultivo fueron diluidas 10 veces. Los valores

reportados corresponden al valor medido multiplicado por el factor de dilución. Posteriormente, con este preinóculo se inocularon 900 mL de medio en matraces Fernbach (2.8 L), incubando a 20 °C y 200 rpm.

El crecimiento celular se siguió durante la fermentación midiendo el incremento de la densidad óptica en el tiempo a 650 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 650.

### 2.3 Electroforesis de proteínas

Las proteínas se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) de acuerdo al método de Laemmli (1970). Se empleó una cámara Mighty small II y geles de 1 mm de espesor, con el gel concentrador al 4% y el de separación al 6% de poliacrilamida. Las células de *L. citreum* se incubaron durante 5 minutos en una solución desnaturizante constituida por Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, SDS 4%, glicerol 20% y azul de bromofenol 0.05%. La migración de las proteínas se realizó a amperaje constante de 30 a 40 mA. Posteriormente los geles siguieron uno de los dos tratamientos siguientes:

- a) **Coloración de proteínas con azul de Coomassie.** Los geles se incubaron en una solución de ácido acético (10% v/v), metanol (30% v/v) y azul de Coomassie (0.2% v/v). Posteriormente se realizaron lavados en una solución de ácido acético (10% v/v) y metanol (30% v/v) para remover el exceso de colorante.
- b) **Coloración con reactivo de Schiff-ácido peryódico (PAS).** Después de la migración, los geles se lavaron tres veces durante 30 minutos con Tween 80 (1%) y buffer de fosfatos pH 6.5 a temperatura ambiente para renaturalizar la IS. Después de esto se incubaron en la misma solución adicionada con sacarosa (100g/L) toda la noche a temperatura ambiente. El polímero producido se fijó incubando los geles en una solución de etanol al 75% v/v durante 30 minutos. Posteriormente se realizó la oxidación de los grupos hidroxilo incubando una hora con una solución

de ácido peryódico al 0.7% v/v y ácido acético al 5% v/v. Transcurrido este tiempo se realizaron tres lavados de 20 minutos cada uno con una solución de metabisulfito de sodio 0.2% p/v y ácido acético 5% v/v. Finalmente se adicionó el reactivo de Schiff hasta detectar la aparición de color. El exceso de colorante se eliminó lavando con una solución de metabisulfito de sodio 0.5% p/v y ácido acético 5% v/v.

#### **2.4 Producción de la Inulosacarasa asociada a células de *Leuconostoc citreum* CW28**

Al alcanzar una densidad óptica de 5, las células del cultivo en matraces Fernbach fueron recuperadas por centrifugación a 5000 rpm en un equipo eppendorf 5810R, durante 15 minutos a 4 °C. Las células se lavaron dos veces con solución amortiguadora de fosfato de potasio pH 6.5 y se resuspendieron en el mismo buffer para ser liofilizadas.

#### **2.5 Extracción de la Inulosacarasa de *Leuconostoc citreum***

Para la extracción de la enzima de las células de *Leuconostoc citreum* se intentaron tres estrategias:

- a) **Tratamiento con cloroformo.** 0.1 g de células liofilizadas fueron resuspendidos en 30 mL de solución amortiguadora de fosfato de potasio y cloroformo (concentración final de 2 %). Las células se incubaron a 32 °C y 100 rpm durante 1, 3 y 13 horas. Después de este tiempo se centrifugaron y se recuperó el sobrenadante (SN). La determinación de actividad se realizó tanto en restos celulares como en el SN.
- b) **Tratamiento con liozima.** 60 mg de células liofilizadas se resuspendieron en 2 y 3 mL de solución amortiguadora de fosfato de potasio y se adicionó liozima a una concentración de 2 y 3 mg/mL durante 2 y 4 horas a 30 °C. Posteriormente se

centrifugó y se recuperó el SN. La determinación de actividad se realizó tanto en restos celulares como en el SN.

- c) **Tratamiento con urea.** Las células cultivadas en un volumen de 1 L y lavadas con buffer de fosfato de potasio fueron resuspendidas en 25 mL de una solución de urea 8 M, e incubadas a temperatura ambiente durante una hora (Hamada y col., 1989). Posteriormente, la suspensión se dializó contra solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 6.5 a 4 °C durante 24 horas, al término de las cuales se centrifugaron a 10000 rpm durante 20 minutos a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. La determinación de actividad se realizó tanto en restos celulares como en el SN.

## 2.6 Cuantificación de proteína

La determinación de proteína se realizó por el método de Lowry en células completas de *L. citreum*, así como en el SN recuperado en la extracción de la inulosacarasa con urea 8 M. Se utilizó como patrón albúmina sérica bovina (fracción V, SIGMA).

## 2.7 Caracterización de productos obtenidos

### 2.7.1 Identificación del manitol

La reacción global (hidrólisis + transferencia) catalizada por la IS se puede esquematizar de la siguiente manera:



Sin embargo, al realizar la síntesis de inulina con la enzima asociada a células, se observó la presencia de un compuesto adicional, probablemente de manitol.

Para confirmar la presencia de una manitol deshidrogenasa intracelular en *Leuconostoc citreum* CW28 y la identificación como manitol del producto, se siguieron los siguientes pasos:

- a) **Purificación.** Para la producción de manitol, se incubaron las células de *L. citreum* con 40 g/ L de fructosa a 30 °C durante 24 h. La purificación se realizó en un equipo de cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) de Waters con detector de IR. Se empleó una columna preparativa  $\mu$ Bondapak NH<sub>2</sub> a 35 °C, con una fase móvil de acetonitrilo/ agua en relación 75:25 y un flujo de 8 mL/ min. Se colectaron las fracciones donde eluía el manitol y se eliminó el acetonitrilo en un rotavapor. Finalmente, se secó la muestra en un evaporador Labnet a doble efecto (35 °C, 500 mbar) .
- b) **Oxidación de manitol a fructosa.** Se incubaron 42 mg de células de *Leuconostoc citreum* CW28 con 8 mg de manitol y 29 mg de NAD<sup>+</sup> ( en relacion equimolar), en 5 ml de buffer Tris- HCl pH 8.7 a 40 °C durante 24 horas. Se tomaron alícuotas de 0.5 mL del medio de reacción a diferentes tiempos y se analizaron en un equipo de HPLC de Waters con un detector de IR y una columna Waters aminada para determinación de carbohidratos (4.6 x 250 mm) a 35 °C. Como fase móvil se utilizó acetonitrilo/ agua en relación 75:25, con un flujo de 1.4 mL/ min.
- c) **Espectrometría de masas.** El análisis de manitol por espectroscopía de masas (MS) se realizó en el Instituto de Química, UNAM.

## 2.8 Determinación de la actividad enzimática

El ensayo de la actividad IS se realizó midiendo la liberación de azúcares reductores durante la reacción en presencia de 100 g/ L de sacarosa en de fosfatos 50 mM pH 6.5 a 30 °C. El poder reductor se determinó por el método del ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS) reportado por Miller(1959). En la reacción enzimática se

emplearon las células completas y la enzima solubilizada mediante los tratamientos descritos.

## 2.9 Determinación de constantes cinéticas

Para determinar las constantes cinéticas tanto de la IS asociada a células como solubilizada mediante el tratamiento con urea, se realizaron reacciones a 30 °C con diferentes concentraciones de sustrato. Las velocidades iniciales de reacción se midieron mediante la liberación de azúcares reductores en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 6.5, así como en un equipo de HPLC de Waters con un detector de IR y una columna aminada para determinación de carbohidratos (4.6 x 250 mm) a 35 °C. Como fase móvil se utilizó acetonitrilo/ agua en relación 75:25, con un flujo de 1.4 mL/ min.

Las concentraciones de glucosa y fructosa medidas en HPLC para determinar las constantes cinéticas de las reacciones de hidrólisis y de transferencia por separado, se consideraron de la siguiente manera:

$$\text{Glucosa libre} = \text{Actividad total}$$

$$\text{Fructosa libre} = \text{Hidrólisis}$$

$$\text{Transferencia} = \text{Glucosa libre} - \text{Hidrólisis}$$

Para determinar la hidrólisis en el caso de la enzima asociada a células, se sumaron las concentraciones de fructosa y de manitol libres.

Las constantes cinéticas se obtuvieron mediante regresión lineal empleando el método de Lineweaver-Burk.

## 2.10 Determinación de la relación hidrólisis/ transferencia

Se analizó la especificidad enzimática hacia hidrólisis y transferencia tanto para la IS solubilizada como para la enzima asociada a células. Para el ensayo se midieron velocidades iniciales incubando ambas formas enzimáticas con diferentes concentraciones de sacarosa a 30 °C.

Para la determinación, se midieron las concentraciones de fructosa, manitol y glucosa en el medio de reacción, considerando la glucosa libre como la actividad total.

Actividad total = Glucosa libre

% Hidrólisis = (fructosa/ glucosa total) \* 100

% Transferencia = 100 - % Hidrólisis

Cuando se emplearon las células completas:

% Hidrólisis = (fructosa + manitol/ glucosa total) \* 100

Las muestras se analizaron en un equipo de cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) de Waters, con un detector de IR y una columna aminada para determinación de carbohidratos (4.6 x 250 mm) a 35 °C. Como fase móvil se utilizó acetonitrilo/ agua en relación 75:25, con un flujo de 1.4 mL/ min.

Las muestras inyectadas fueron filtradas previamente para retirar el polímero y las células en filtros ACRODISCO GHP 13mm x 0.45 µm.

## 2.11 Reacciones de aceptor

La capacidad de la enzima asociada a células para llevar a cabo reacciones de aceptor se analizó incubando las células en buffer de fosfato de potasio con 60 g/ L de

sacarosa a 30 °C y pH 6.5. Como aceptores se emplearon glucosa, maltosa y lactosa en relación másica aceptor/ sacarosa de 1 y 2. Posteriormente las células fueron separadas por centrifugación y los productos de reacción se analizaron en HPLC empleando una columna para análisis de carbohidratos bajo las condiciones descritas anteriormente.

## 2.12 Producción de inulina en planta piloto

La producción de inulina en la planta piloto estuvo dividida en tres etapas, las cuales se describen a continuación:

- a) **Obtención de la IS asociada a células de *Leuconostoc citreum* CW28.** Se realizaron cultivos de 100 mL de medio estéril en matraces de 250 mL a 20 °C y 200 rpm para la producción del inóculo, partiendo de células almacenadas en glicerol a -20 °C. Después de alcanzar una densidad óptica de 5 se inocularon matraces Fernbach conteniendo 900mL de medio. Posteriormente se inoculó con 3L un fermentador B. Braun (Biostat UD, 30 L), y se realizó un cultivo con las siguientes condiciones: 0.25 vvm, 150 rpm y 20 °C. Después de 5 horas, cuando se alcanzó una densidad óptica de 5.5, las células fueron recuperadas mediante centrifugación en un equipo Westfalia (CSA 1- 06- 475) a 10 000 rpm.
- b) **Producción de inulina.** La reacción para la producción de inulina se realizó en el mismo fermentador B. Braun. Las células de *L. citreum* se resuspendieron en solución amortiguadora de fosfato de potasio 50 mM pH 6.5 con una concentración de sacarosa de 250 g/ L en un volumen de trabajo de 30 L. La actividad enzimática para este proceso fue de 0.7 U/ mL y se desarrolló a 30 °C. La agitación se incrementó en el transcurso de la reacción de 150 a 250 rpm. El pH del medio se mantuvo en 6.5 mediante la adición controlada de NaOH 4 M. Después de 40 horas la reacción se detuvo y las células fueron separadas en una centrífuga Sharples (AS- 16) a 14 000 rpm.

- c) **Precipitación y secado de la inulina.** Una vez retiradas las células, el polímero del medio fue precipitado adicionando etanol (en relación 1:2 v/v). Posteriormente una parte de la inulina sintetizada fue secada en una liofilizadora USIFROID (SMH- IS) y otra parte se secó por aspersion usando un secador BOWEN (BE- 1448), con un flujo de 100 mL/min, temperatura de entrada de 135 °C y presión de 1 kg/cm<sup>2</sup>.

## 2.13 Análisis de la inulina

### 2.13.1 Determinación del peso molecular

El análisis del peso molecular de la inulina se realizó en un HPLC de Waters con un detector IR empleando dos columnas de permeación en gel en línea: Ultrahydrogel lineal y Ultrahydrogel 500 a una temperatura de 35 °C. Se empleó nitrato de sodio 100 mM como fase móvil y un flujo de 0.9 mL/ min. Las muestras se inyectaron a una concentración de 2 mg/ mL.

Se analizó la influencia de la concentración de sustrato, de la forma enzimática (enzima solubilizada y asociada a células) y del tiempo de reacción en la variación del peso molecular de la inulina. Para los dos primeros casos se emplearon 20, 100 y 250 g/L de sacarosa. La determinación de acuerdo al tiempo de reacción se realizó con 100 g/L de sacarosa. El polímero se precipitó con etanol (en relación 1:2) y posteriormente fue secado en un evaporador Labnet a doble efecto.

### 2.13.2 Pureza

Para determinar el grado de pureza de la inulina sintetizada con células completas se suspendieron 67 mg de inulina liofilizada en 1 mL de agua destilada y a continuación se separó el polímero por medio de filtros ACRODISCO GHP (13mm x 0.45 µm). El

sobrenadante se analizó mediante HPLC bajo las condiciones antes mencionadas para determinación de azúcares.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Condiciones de crecimiento

Como se mencionó en los objetivos, uno de los aspectos primordiales en que se centra este trabajo es en la producción de un polímero de gran importancia industrial: la inulina. Sin embargo, a pesar de que la inulosacarasa lleva a cabo reacciones de síntesis y de hidrólisis, al analizar los productos de la reacción con sacarosa en lotes de células producidos para el desarrollo de esta tesis, se encontró que la especificidad enzimática se dirigía prácticamente en su totalidad hacia la hidrólisis. Cabe mencionar que los ensayos se realizaron con la enzima asociada a células producidas en una fermentación a 30 °C y liofilizadas posteriormente. En estudios previos la enzima mostraba un alto porcentaje de transferencia, incluso mayor al de otras fructosiltransferasas reportadas.

En un intento por dilucidar el problema, se hicieron pruebas de actividad en geles de poliacrilamida incubando con sacarosa (100g/L) toda la noche, previa renaturalización con Tween 80. La detección del polímero formado se realizó mediante la técnica del ácido peryódico-Shiff (PAS). Se utilizó como control un lote de células preparadas con anterioridad y que aún presentaban mayoritariamente la reacción de transferencia.

Como se observa en la figura 11A, se encontraron tres bandas de proteína con actividad enzimática, adicionales a la banda principal de 165 kDa, lo que indica probablemente que son producto de proteólisis de la enzima original.

Partiendo de la hipótesis de que las formas enzimáticas producto de la proteólisis son más hidrolíticas, y de que eran obtenidas por algún cambio en la forma de producir la enzima, se cambiaron los lotes de los componentes del medio de cultivo para eliminar la posibilidad de que alguno estuviese influyendo en este fenómeno y se probaron varios lotes de extracto de levadura. Sin embargo, como puede constatarse en la Figura 11A, con cada uno de estos cambios, el patrón de bandas observadas fue el mismo.

Con base en un antecedente del laboratorio en el que se observó que el extracto de levadura influía en la producción de proteasas en *Leuconostoc mesenteroides*, este

componente del medio de cultivo se reemplazó por otras fuentes de nitrógeno, específicamente sulfato de amonio, peptona, triptona y agua de cocimiento de maíz.

El análisis por HPLC de los productos de la reacción con 100g/L de sacarosa a 30 °C, mostró un incremento en la actividad de transferencia cuando se emplearon sulfato de amonio y peptona como fuente de nitrógeno (Tabla 3).

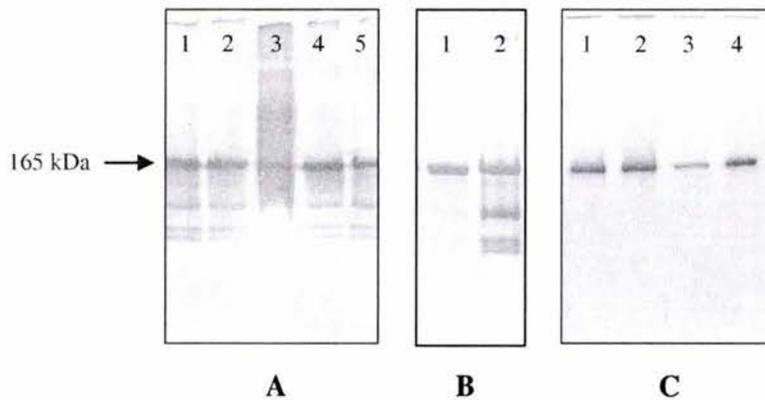
**Tabla 3.** Especificidad de la enzima asociada a células provenientes de medios de cultivo con fuentes de nitrógeno diferentes.

| Especificidad (%) | Células de referencia | Sulfato de amonio | Peptona | Triptona | Licor de maíz | Extracto de levadura |
|-------------------|-----------------------|-------------------|---------|----------|---------------|----------------------|
| Hidrólisis        | 27                    | 49                | 49      | 57       | 56            | <b>98</b>            |
| Transferencia     | 73                    | 51                | 51      | 43       | 44            | <b>2</b>             |

Para tratar de modular la actividad proteolítica empleando extracto de levadura como fuente de nitrógeno, se modificó el pH inicial del medio de cultivo para producir la enzima de 6.9 a 5, ya que en trabajos anteriores se observó que las proteasas de *Leuconostoc mesenteroides* eran más activas a pH 7 y alcalinos. La temperatura de crecimiento de *L. citreum* se redujo de 30 a 20 °C. Sin embargo, realizando la fermentación a 30 °C y partiendo de un pH inicial de 5 no se aumentó la relación transferencia/hidrólisis. La actividad de transferencia fue recuperada partiendo de un pH inicial de 6.9 en la fermentación y creciendo a *Leuconostoc citreum* a 20 °C. En la figura 11B puede observarse que la disminución de la temperatura de producción permite evitar la digestión de la IS correspondiente a la enzima nativa (165 kDa)

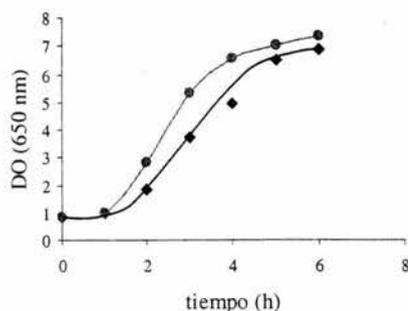
Posteriormente, las células obtenidas bajo las condiciones antes descritas (pH 6.9, 20 °C), se incubaron durante 26 h a diferentes temperaturas con 25 g/L de sacarosa en buffer de fosfatos pH 6.5, el óptimo para la actividad inulosacarasa, empleando agitación magnética (250 rpm). Lo anterior se realizó con la finalidad de determinar si el proceso proteolítico era posterior a la producción de las células y si una vez producidas había

riesgo de proteólisis. Puede constatarse que la enzima no se degrada después del proceso de producción a pesar de incubarla a diferentes temperaturas (figura 11C), por lo que puede concluirse que en la aparición del fenómeno descrito anteriormente, la temperatura de la fermentación es el elemento clave. Aunque este cambio permitió resolver el problema de producción de la enzima, no explica cómo se originó la proteólisis a 30 °C no observada con anterioridad.



**Figura 11.** Geles de SDS-PAGE teñidos con el reactivo de Schiff. La fermentación para la obtención de las células se realizó empleando extracto de levadura y pH inicial de 6.9. A) IS de células crecidas a 30 °C. Control: IS de células de referencia (3); IS producida con lotes diferentes de extracto de levadura (1, 2, 4 y 5). B) IS de células obtenidas a 20 °C (1) y 30 °C (2). C) Células obtenidas a 20 °C. Control: IS de células sin incubar(1); IS después de incubar las células durante 26 h a: 30 °C (2); 15 °C (3) y 2 °C (4).

En las fermentaciones previas llevadas a cabo a 30 °C, las células de *L. citeum* se recuperaban una vez alcanzada la fase estacionaria (DO = 6), ya que en este punto se observó mayor actividad de la inulosacarasa. Con el crecimiento a 20 °C, la recuperación de las células se realizó al alcanzar una DO de 5 para evitar la proteólisis de la enzima, ya que se observaron bandas adicionales después de 5 h de fermentación. En la figura 12 se muestran las curvas de crecimiento de *Leuconostoc citreum* a 20 y a 30 °C.



**Figura 12.** Curva de crecimiento de *Leuconostoc citreum*. (●) 30 °C; (◆) 20 °C.

En conclusión, al disminuir la temperatura a 20 °C, si bien se pierde en productividad, el beneficio es mayor, pues se evita no solo la pérdida de enzima por degradación, sino también el cambio de especificidad de la reacción hacia la hidrólisis del sustrato .

### 3.2 Extracción de la Inulosacarasa de *Leuconostoc citreum*.

Kees y col. (1999) reportaron cuatro formas de unión de proteínas ubicadas en la pared celular para bacterias ácido lácticas: unión transmembranal (A1), unión covalente a lipoproteínas (A2), unión covalente a la pared celular (A3), unión a la pared celular (A4), cuyo mecanismo de anclaje se desconoce y unión superficial no covalente a la pared celular (A5).

La forma de anclaje a la pared celular de la inulosacarasa de *Leuconostoc citreum* CW28 no ha sido determinada, por lo que para solubilizarla se siguieron tres protocolos: tratamientos con lisozima, con cloroformo y con urea. En el primer caso no se detectó actividad inulosacarasa (IS) ni en el sobrenadante ni en los restos celulares, probablemente debido a la liberación de proteasas al hidrolizar la pared celular. En el segundo tratamiento, después de incubar durante una hora con cloroformo para permeabilizar las células, solo se recuperó 3 % de actividad en el sobrenadante y 90 % de actividad residual en células. En tiempos de incubación mayores, la actividad IS se perdió tanto en células como en sobrenadante, probablemente debido a la inactivación de la enzima por el cloroformo. El tratamiento con urea 8M (Hamada y col., 1989) resultó ser el más exitoso para la solubilización de la enzima, al recuperar 16 % de actividad IS en el

sobrenadante y 60 % de actividad residual en células. Es posible que una parte de la enzima no se renaturalice, ya que se pierde aproximadamente el 24 % de la actividad. No se detectó actividad IS al incrementar el tiempo de incubación con urea. Es probable que no se trate de uniones tipo A2 y A3, ya que se trata de enlaces covalentes que no podrían ser escindidos por la urea.

Es importante constatar que la enzima se encuentra fuertemente asociada a la pared celular. Aún cuando no se ha determinado el tipo de anclaje, suponemos que tampoco se trata de los tipos A4 y A5. Se ha reportado que proteínas con un dominio de unión tipo A4, usualmente son detectadas tanto en fracciones de pared celular como en el sobrenadante, lo que sugiere que la interacción con la pared celular de la región de unión A4 es más débil que en las de tipo A3 (Kees y col, 1999).

A partir de este resultado, se puede concluir que en el diseño de un catalizador, lo más adecuado parece ser el uso de células completas.

### **3.3 Caracterización de productos obtenidos**

#### **3.3.1 Producción de manitol**

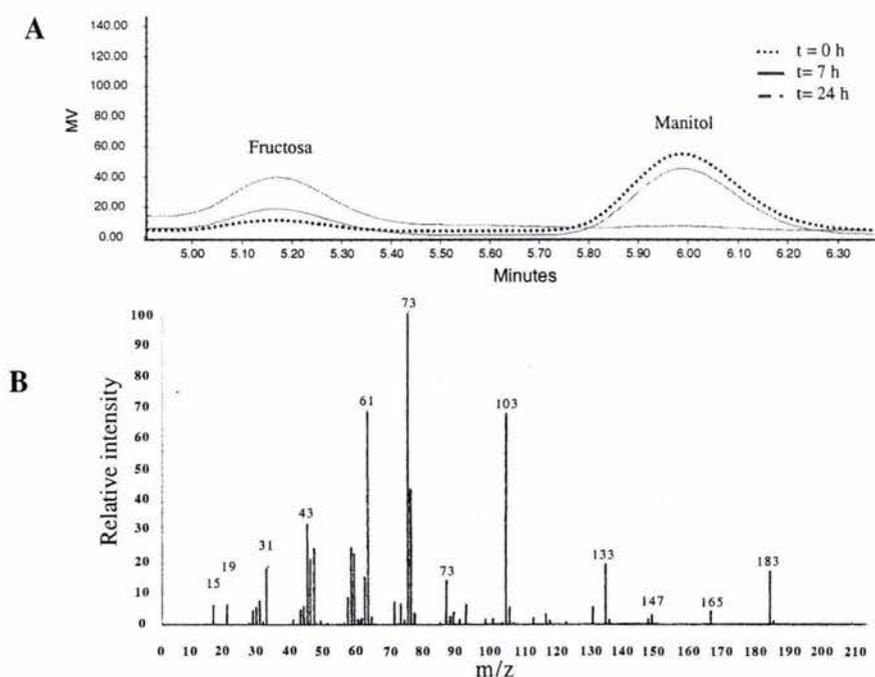
El análisis de los compuestos encontrados en el medio de reacción al incubar la sacarosa con la inulosacarasa solubilizada, indicó la presencia de inulina, glucosa, fructosa y sacarosa residual. En presencia de sacarosa, la inulosacarasa puede llevar a cabo la síntesis de inulina y la hidrólisis del sustrato, por lo que los compuestos anteriores provienen de ambas reacciones.

Sin embargo, al analizar los productos de la reacción observados en HPLC de la inulosacarasa asociada a células con sacarosa, se encontró que además de los compuestos ya mencionados, se producía un compuesto adicional que se supuso era manitol.

La identificación de este poliol se realizó tomando como referencia la producción de una manitol deshidrogenasa intracelular por *Leuconostoc mesenteroides* (Dols y col., 1997). Esta enzima cataliza la reducción de fructosa a manitol en presencia de NADH.

El tiempo de retención del manitol en HPLC es muy cercano al de la glucosa, por lo que para su purificación se incubaron las células de *L. citreum* con fructosa y no con sacarosa, evitando de esta forma la liberación de glucosa al medio.

Modificando las condiciones de reacción y adicionando  $\text{NAD}^+$ , la manitol deshidrogenasa cataliza también la oxidación del manitol a fructosa, por lo que el compuesto purificado se incubó con las células de *L. citreum* bajo las condiciones descritas en materiales y métodos, siguiendo la reacción en el tiempo. Al final de la reacción, todo el manitol se redujo a fructosa (Figura 13A). Finalmente, el análisis por espectrometría de masas realizado en el instituto de Química de la UNAM del compuesto purificado, confirmó la identidad del producto (figura 13B).



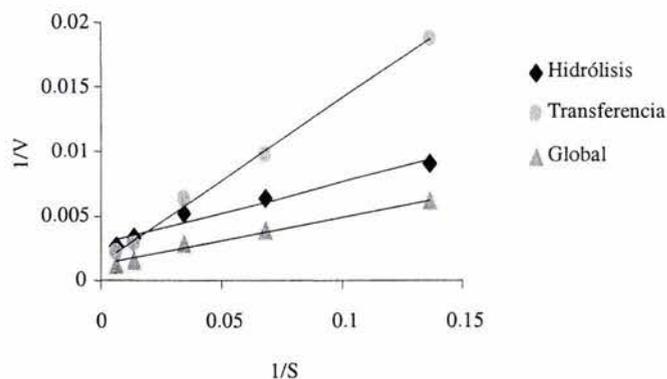
**Figura 13.** Identificación del manitol. A) análisis por HPLC de la regeneración de fructosa a partir de  $\text{NAD}^+$  y manitol purificado de la reacción de síntesis, empleando células completas. B) espectro de masas del 1-D- manitol purificado de la reacción de síntesis.

En una de las hipótesis iniciales se proponía que podía tratarse de un disacárido o algún otro producto resultado de la actividad transferasa de la IS. La caracterización de este compuesto nos permitió eliminar la posibilidad de que la IS estuviese catalizando la

formación de algún producto adicional a los ya mencionados. Se estableció también que su origen, al trabajar con células completas, está relacionado con la presencia de la manitol deshidrogenasa intracelular, ya que no se detectó actividad en el sobrenadante.

### 3.4 Determinación de las constantes cinéticas

Las constantes cinéticas determinadas mediante regresión lineal empleando el método de Lineweaver-Burk (Figura 14) para la enzima en solución y asociada a células se muestran en la tabla 4.



**Figura 14.** Regresión lineal mediante el método de Lineweaver-Burk. Para la determinación de las constantes cinéticas de las reacciones de hidrólisis y transferencia se utilizó la enzima solubilizada.

De acuerdo con los parámetros obtenidos, la reacción de hidrólisis es aproximadamente 2.6 veces más eficiente que la de transferencia, ya que la velocidad para la transferencia del residuo fructosilo hacia el polímero es mayor

En análisis posteriores se logró dirigir la reacción mayoritariamente hacia la síntesis de inulina modificando la concentración de sustrato.

La diferencia de afinidad observada para la reacción global (hidrólisis y transferencia) entre la enzima asociada y en solución, puede ser el producto de

resistencias difusionales, ya que es probable que el polímero se concentre cerca de las células o unido a ellas, dificultando el acceso de la sacarosa al sitio activo.

**Tabla 4.** Constantes cinéticas para la enzima asociada a células y en solución (U=  $\mu$ moles de: \*fructosa transferida y sacarosa hidrolizada; \*\* sacarosa hidrolizada o \*\*\*fructosa transferida.  $\text{min}^{-1}$ )

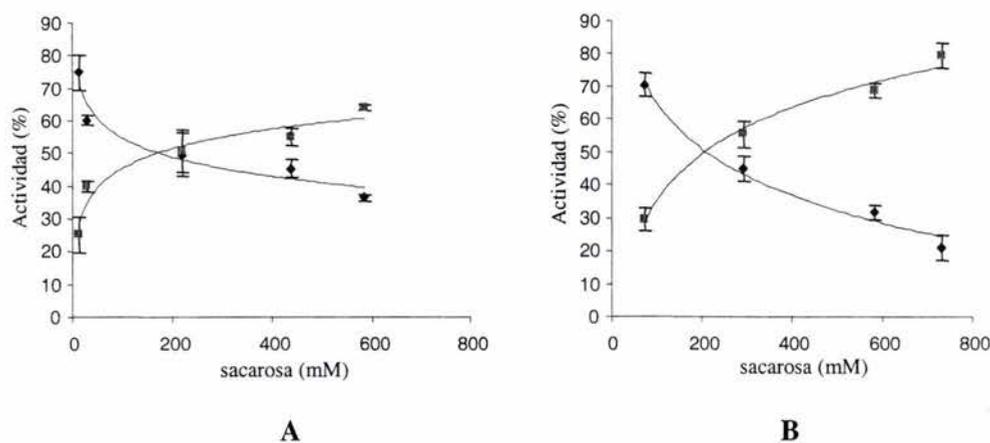
|                           |                 | $k_2$                    | Km (mM) |
|---------------------------|-----------------|--------------------------|---------|
| Enzima Asociada a células |                 | (U/mg de proteína total) |         |
|                           | Reacción global | 0.89*                    | 66      |
| Enzima en solución        |                 | (U/mg de enzima)         |         |
|                           | Reacción global | 834*                     | 38      |
|                           | Hidrólisis      | 357**                    | 17      |
|                           | Transferencia   | 526***                   | 64      |

### 3.5 Determinación de la relación hidrólisis/transferencia

Tomando como referencia que a concentraciones de sacarosa menores a 20 g/L, las levansacarosas de *B. subtilis* y *A. diazotrophicus* exhiben sólo actividad hidrolítica (Song y Jacques, 1999), se intentó dirigir la especificidad de la reacción con la inulosacarasa hacia una mayor síntesis de inulina modificando la concentración de sacarosa inicial en el medio.

Empleando la enzima tanto en solución como asociada a células, se observó un incremento en la relación transferencia/hidrólisis proporcional a la concentración de sacarosa (figura 15 A y B).

Este efecto se encuentra relacionado probablemente no solo con el aumento en el número de moléculas aceptoras para la reacción de transferencia, sino con el contenido total de sólidos en el medio, ya que el nivel de transferencia hacia síntesis de polímero se mantuvo constante en el transcurso de la reacción (no se muestra).



**Figura 15.** Especificidad de la reacción con diferentes concentraciones de sacarosa. A) inulosacarasa en solución; B) inulosacarasa asociada a células. (♦) hidrólisis; (▪) transferencia.

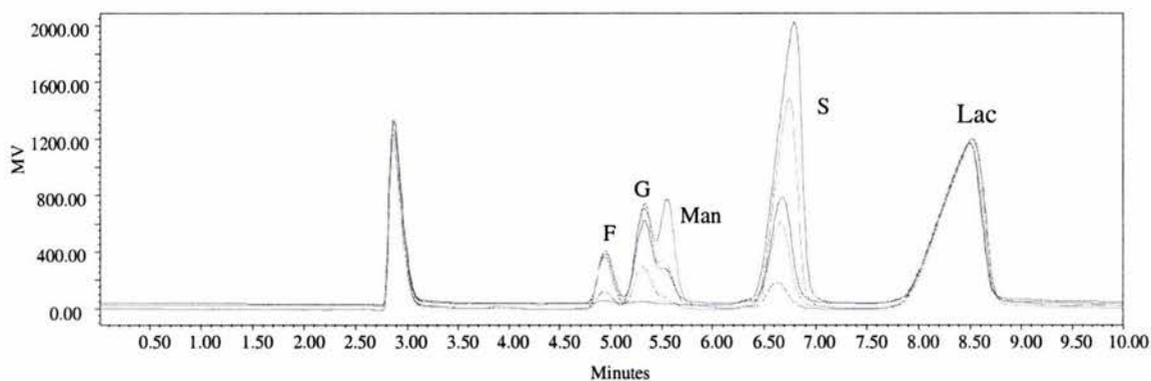
La importancia de este resultado radica en haber identificado el problema que implicaría la síntesis con bajas concentraciones de sacarosa. Sin embargo, se trata de condiciones de proceso poco probables, pues en general se busca la alta productividad asociada con las altas concentraciones de sacarosa.

Es probable que una disminución en la concentración de agua, aunada al aumento en la concentración de un aceptor alternativo, explique la disminución en la reacción de hidrólisis. Este mismo efecto ha sido reportado por Castillo y López-Munguía (2004) para la levansacarasa en presencia de solventes.

### 3.6 Reacciones de aceptor

Una característica que comparten varias FTF<sub>s</sub> es la capacidad para transferir el residuo fructosilo, además de al agua, hacia algunas moléculas alternativas a la sacarosa que actúan como aceptoras del mismo. La síntesis de fructósidos es el resultado de estas reacciones de aceptor. Sin embargo, la enzima sintetizó únicamente inulina cuando se incubaron las células de *L. citreum* CW28 con actividad inulosacarasa y diversos aceptores como glucosa, maltosa y lactosa en relación 1:1 y 1:2 con sacarosa. No se observaron reacciones de transferencia del residuo fructosilo hacia estas moléculas, demostrando que las cadenas de inulina o el agua son mucho más activas para aceptar el fructósido que las moléculas ensayadas. En el caso de la dextransacarasa, una GTF de *Leuconostoc mesenteroides*, la maltosa desplaza casi totalmente la síntesis hacia el trisacárido panosa.

En la figura 16 puede observarse que después de 24 h, la concentración de lactosa permanece constante.



**Figura 16.** Análisis en HPLC de las reacciones de aceptor. La concentración constante de lactosa durante el transcurso de la reacción (24 h), al incubar las células de *L. citreum* con sacarosa y lactosa en relación 1:1, indica que la enzima no realiza reacciones de aceptor. F-fructosa; G-glucosa; Man-manitol; S-sacarosa y Lac-lactosa.

### 3.7 Producción de inulina en planta piloto

Con la finalidad de preparar un lote de inulina que permitiera iniciar estudios de nutrición animal paralelos a este trabajo, se realizó la producción de inulina en la planta piloto en un reactor de 30 L, empleando las condiciones a las cuales se obtuvo una mayor relación transferencia/hidrólisis, es decir, la enzima asociada a células y una concentración de sacarosa de 250 g/L.

Las operaciones realizadas y las condiciones de reacción se resumen en la figura 17.



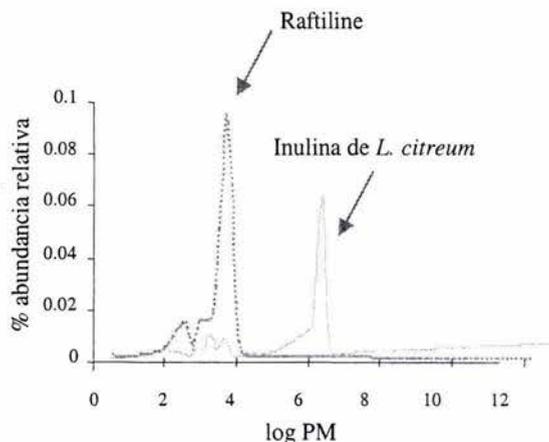
Figura 17. Diagrama de la producción de inulina en la planta piloto.

Después de 40 horas de reacción se convirtió el 84 % del sustrato. De la totalidad de sacarosa transformada, 24 % se hidrolizó y el 76 % restante se dirigió hacia la síntesis de polímero.

### 3.8 Análisis de la inulina

#### 3.8.1 Determinación del peso molecular

La inulina producida en la planta piloto presentó una distribución bimodal de pesos moleculares. Como se muestra en la figura 16, se observa una primera distribución de pesos moleculares de 400 a 7400 Da, y una segunda entre 90000 y 4 400 000 Da, mostrando un máximo preferencial en 2 300 000 Da. Al realizar la comparación con la inulina comercial de origen vegetal (Raftiline®), se determinó que las diferencias en PM fueron hasta de tres ordenes de magnitud, ya que la Raftiline® consiste en inulina con un peso molecular promedio de 8 300 Da, teniendo además una distribución mucho menos dispersa (Figura 18).



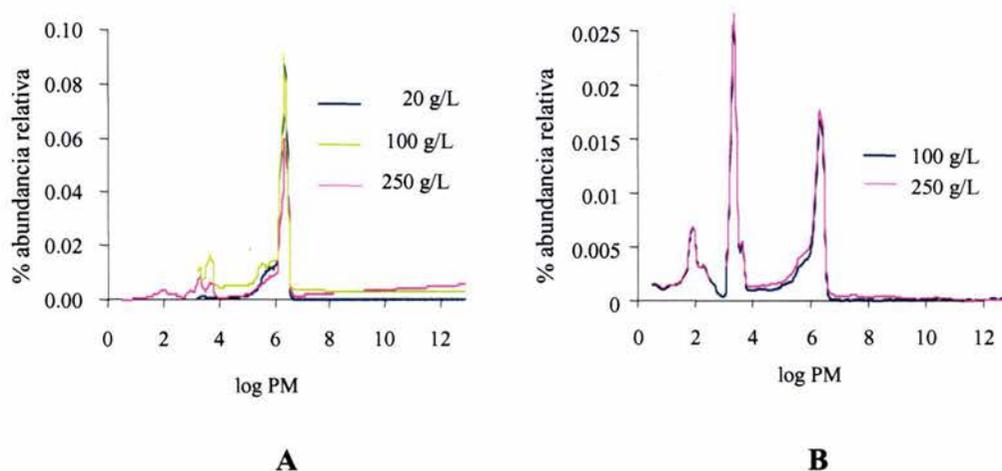
**Figura 18.** Distribución de pesos moleculares de la inulina comercial (Raftiline\*) y la inulina producida por *Leuconostoc citreum* CW28.

La distribución de pesos moleculares varía dependiendo de la forma enzimática empleada, ya que cuando la enzima se encuentra asociada se sintetiza prácticamente solo inulina de alto peso molecular (figura 19A), en tanto que con la enzima en solución

aumenta la producción de polímero similar al de la inulina de origen vegetal (Figura 19B).

Este comportamiento ya ha sido observado con anterioridad por Steinberg y col, (2002) y por Chambert y col. (1993), al inmovilizar FTF<sub>s</sub>, en el primer caso de *S. mutans* y en el segundo de *B. subtilis* sobre hidroxiapatita (HA). En ambos casos se propone que la distribución bimodal puede sugerir la elongación de la cadena por dos mecanismos diferentes: crecimiento de una cadena para el polímero de bajo peso molecular, y crecimiento múltiple para el polímero de peso molecular elevado. Se propone que al modificar las condiciones de reacción, se influye de alguna manera en el mecanismo de elongación. Un amplio rango en la distribución de pesos moleculares elevados es típico del mecanismo de crecimiento múltiple, y puede ser observado en la figura 19B.

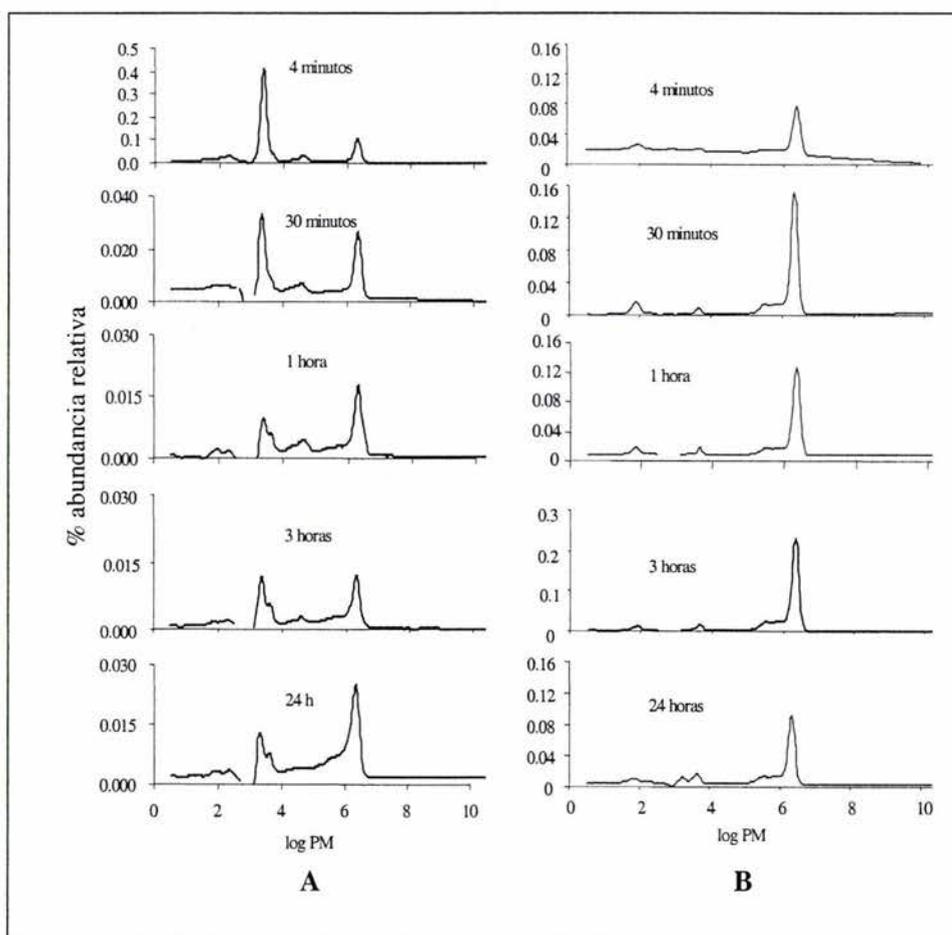
Ki-Hyo y col. (2001), reportaron un decremento en la producción de levana sintetizada por la levansacarasa de *Zymomonas mobilis* expresada en *E. coli* a concentraciones de sacarosa superiores a 200 g/L, probablemente debido a la formación de oligosacáridos a altas concentraciones de sustrato.



**Figura 19.** Influencia de la concentración de sacarosa en el peso molecular de la inulina. Distribución de pesos moleculares de la inulina producida por la inulosacarasa de *L. citreum* CW28 con diferentes concentraciones de sacarosa: A) asociada a células y B) en solución.

A las concentraciones ensayadas de sacarosa (20 a 250 g/L), no se observaron variaciones en el peso molecular de la inulina en ninguna de las formas enzimáticas (figura 19). Sin embargo, es necesario aumentar la concentración de sustrato arriba de 250 g/L para poder concluir si la inulosacarasa sigue o no este comportamiento.

Al analizar la variación del peso molecular de la inulina con el tiempo de reacción empleando ambas formas enzimáticas, podemos observar que en el polímero producido por la enzima asociada a células el peso molecular se mantiene constante, lo que no sucede con la inulina sintetizada por la enzima en solución (figura 20).



**Figura 20.** Distribución de pesos moleculares a diferentes tiempos de reacción. A) enzima solubilizada; B) enzima asociada a células.

Es probable que existan resistencias difusionales del polímero sintetizado cuando la enzima se encuentra asociada y que solo sea liberado al medio de reacción al alcanzar cierto tamaño. Esto explicaría también la diferencia de los pesos moleculares al emplear una u otra forma enzimática.

El resultado anterior coincide con lo reportado por Steinberg y col. (2002). Estos autores observaron al inmovilizar FTFs sobre HA, una variación en la relación de pesos moleculares entre las fructanas retiradas de la superficie del catalizador mediante lavados del mismo, y aquellas que permanecían adheridas y que fueron retiradas mediante sonicación, siendo las últimas de peso molecular menor.

### **3.8.2 Pureza**

Finalmente, se analizó por HPLC el contenido de azúcares digeribles resultantes del proceso de producción del polímero y que no fueron eliminados en la etapa de precipitación. Los azúcares encontrados fueron glucosa (38 g/L) y sacarosa (10 g/L), además de manitol (38 g/L), que como se mencionó anteriormente, proviene de la reducción de la fructosa por la manitol deshidrogenasa intracelular. Dada la naturaleza segura de estos azúcares y del manitol, consideramos que la calidad del producto no es afectada, por lo que no se procedió a la purificación de la inulina.

Cabe mencionar que el contenido de azúcares en la inulina comercial de origen vegetal, (Raftiline®) varía entre 80 y 120 g/L, a excepción de la Raftiline® HP, en la que se eliminan azúcares y oligosacáridos.

## CONCLUSIONES

La inulosacarasa de *Leuconostoc citreum* CW28 sufre proteólisis al ser producida a 30 °C y cambia su especificidad dirigiéndola prácticamente en su totalidad hacia la hidrólisis de la sacarosa. Al modificar la temperatura de crecimiento de *L. citreum*, se recupera la actividad de transferencia. Después de ser producida a 20 °C, la enzima asociada a células permanece estable. El origen de la proteólisis no fue establecido.

Se determinó la presencia de una manitol deshidrogenasa intracelular dependiente de NADH en *Leuconostoc citreum* CW28. Esta enzima reduce la fructosa libre del medio a manitol al realizar la síntesis de inulina con la inulosacarasa asociada a células. El manitol fue identificado por espectrometría de masas.

Se determinaron las constantes cinéticas para las reacciones de transferencia e hidrólisis, empleando la enzima solubilizada mediante un tratamiento con urea. La inulosacarasa mostró una menor afinidad por el polímero que por el agua para transferir el residuo fructosilo y es 2.6 veces más eficiente para transferir el residuo fructosilo hacia esta molécula. Fue posible dirigir la reacción mayoritariamente hacia la producción de inulina con ambas formas enzimáticas, al aumentar la disponibilidad de sacarosa en el medio. No se observaron reacciones de transferencia del residuo fructosilo hacia otras moléculas como lactosa, glucosa y maltosa.

El polímero producido por la IS asociada a células presenta una distribución monomodal de pesos moleculares, en tanto que el sintetizado por la enzima solubilizada muestra un perfil bimodal. La relación entre la inulina de peso molecular bajo y elevado fue aproximadamente de uno para la enzima en solución. Es probable que la distribución bimodal del polímero obedezca a dos mecanismos diferentes de elongación de cadena.

El análisis comparativo entre la inulina producida por la inulosacarasa de *L. citreum* CW28 en su forma asociada y la inulina comercial de origen vegetal (Raftiline®), mostró una gran diferencia en relación a los pesos moleculares. Es importante señalar que los estudios que sustentan a la inulina como prebiótico, han sido realizados con inulina de

origen vegetal, por lo que estudios de nutrición tanto animal como en humanos son esenciales para determinar si este polímero puede ser ubicado como prebiótico.

Cabe mencionar que una de las distribuciones de peso molecular presentadas por la inulina de *L. citreum* CW28, corresponde al peso de la Raftiline®, por lo que resulta atractivo tratar de modular el grado de polimerización, especialmente con la enzima en solución.

Después de definir las condiciones para una mayor productividad de inulina, se realizó la producción de este polímero en la planta piloto con la enzima asociada, alcanzando una producción de 80 g/L.

---

## BIBLIOGRAFIA

Carabin, I.G. y Flamm, W.G. 1999. Evaluation of Safety of Inulin and Oligofructose as Dietary Fiber. *Regul Toxicol Pharmacol.* **30**: 268-282.

Carpita, N.C., Kanabus, J., y Housley, T.L. 1989. Linkage structure of fructan and fructan oligomers from *triticum aestivum* and *Festuca arundinaceae* leaves. *J Plant Physiol.* **134**: 162-168.

Chambert, R. y Gonzy- Treboul, G. 1976. Levansucrase of *Bacillus subtilis*. Characterization of a Stabilized Fructosyl-Enzyme Complex and Identification of an Aspartyl Residue as the Binding Site of the Fructosyl Group. *Eur J Biochem.* **71**: 493-508.

Chambert, R., Treboul, G., y Dedonder, R. 1974. Kinetic Studies of Levansucrase of *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem* **41**: 285-300.

Chambert, R., y Petit-Glatron, M. 1993. Immobilisation of levansucrase on calcium phosphate gel strongly increases its polymerase activity. *Carbohydr Res.* **244**: 129-36.

Dols, M., Chraïbi, W., Remaud-Simeon, M., Lindley, N. y Monsan, P. 1997. Growth and energetics of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 during metabolism of various sugars and their consequences for dextransucrase production. *Appl Environ Microbiol.* **63**: 2159-2165.

Duboc, P. y Mollet, B. 2001. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *Int Dairy J.* **11**: 759-768.

Edelman, J. y Jefford, T.G. 1968. The mechanism of fructosan metabolism in plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New Phytol.* **67**: 517-531.

Franck, A. 2002. Technological functionality of inulin and oligofructose. *Br J Nut.* **87**: S287-S291.

Gibson, G.R., Beatty, E.R., Wang, X. y Cummings, J.H. 1995. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology.* **108**: 975-982.

Hamada, S., Horikoshi, T., Minami, T., Okahashi, N. y Koga, T. 1989. Purification and Characterization of cell- associated glucosyltransferase synthesizing water- insoluble glucan from serotype *c Streptococcus mutans*. *J Gen Microbiol.* **135** : 335-344.

- 
- Harada, T., Suzuki, S., Taniguchi, H. y Sasaki, T. 1994. Characteristics and applications of a polyfructan synthesized from sucrose by *Aspergillus sydowi* conidia. En K. Nishinari y E. Doi (ed.), *Food Hydrocolloids: Structure, properties, and functions*. Plenum Press, N.Y. pp 77-82.
- Hendry, G.A.F. y Wallace, R.K. 1993. The origin, distribution, and evolutionary significance of fructans. En M Suzuki, NJ Chatterton (eds), *Science and Technology of Fructans*. CRC Press, Boca Raton, FL. pp 119-139.
- Henrissat, B. y Davies, G. 1997. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr Opin Struct Biol.* **7**: 637-644.
- Heyer, A.G. y Wendenburg, R. 2001. Gene Cloning and Functional Characterization by Heterologous Expression of the Fructosyltransferase of *Aspergillus sydowi* IAM 2544. *Appl Environ Microbiol.* **67**: 363-370.
- Hirayama, M., Sumi, N. y Hidaka, H. 1989. Purification and properties of a fructooligosaccharides- producing beta- fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Agr Biol Chem.* **53**: 668-674.
- Kawai, G., H. Taniguchi, y M. Nakamura. 1973. Polyfructan and oligofructan synthesized from sucrose by conidia of *Aspergillus sydowi* IAM 2544. *Agr Bio Chem.* **37**: 2111-2119.
- Kees, L., Girbe, B. y Jan, K. 1999. Anchoring of proteins to lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* **76**: 367-376.
- Ki-Hyo, J., Ki-Banng, S., Buem-Seek, P., Chul, H., Bong,H., Ryo, W., Kwang, S., Chan, L., Uck, H. y Sang, K. 2001. Levan production by use of the recombinant levansucrase immobilized on titanium-activated magnetite. *Process Biochem.* **37**: 339-343.
- Kolida, S., Tuohy, K. y Gibson, G.R. 2002. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *Br J Nutr.* **87**: S193-S197.
- Kruse, H.P., Kleessen, B. y Blaut, M. 1999. Effects of inulin on faecal bifidobacteria in human subjects. *Br J Nutr.* **82**: 375-382.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
- LeBrun, E. y van Rapenbusch, R. 1980. The Structure of *Bacillus subtilis* Levansucrase at 3.8 Å Resolution. *J Biol Chem.* **255**, no. 24, 12034-12036.

- 
- Meng, G y Fütterer, K. 2003. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nat Struct Biol.* **10**: 935-41.
- Miller, G.L. 1959. Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem.* **31**: 426-428.
- Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R.M. y Remaud-Siméon, M. 2001. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int Dairy J.* **11**: 675-685.
- Muramatsu, M. y Nakakuki, T. 1995. Enzymatic synthesis of novel fructosyl and oligofructosyl trehaloses by *Aspergillus sydowi* beta- fructofuranosidase. *Biosc Biotech Biochem.* **59**: 208-212.
- Niness, K.R. 1999. Nutritional and Health Benefits of Inulin and Oligofructose. Inulin and Oligofructose: What are they? *J. Nutr.* **129**: 1402S-1405S.
- Nurizzo, D., Turkenburg, J. P., Charnock, S. J., Roberts, S.M., Dodson, E. J., McKie, V. A., Taylor, E. J., Gilbert, H. J. y Davies, G. J. 2002. *Cellvibrio japonicus*  $\alpha$ -L-arabinanasa 43A has a novel five-blade  $\beta$ -propeller fold. *Nat Struct Biol.* **9**: 665-668.
- Olah, A., Papp, Z. y Szentirmai, A. 1993. Inulin formation of penicillin producing industrial *Penicillium chrysogenum* strains. *Acta Microbiol Hung.* **40**: 379-386.
- Olivares-Illana, V., López-Munguía, A. y Olvera, C. 2003. Molecular Characterization of Inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a Fructosyltransferase Within a Glucosyltransferase. *J Bacteriol.* **185**: 3606-3612.
- Olivares-Illana, V., Wachter-Rodarte, C., Le Borgne S. y López-Munguía, A. 2002. Characterization of a cell-associated inulosucrase from a novel source: A *Leuconostoc citreum* strain isolated from *Pozol*, a fermented corn beverage of Mayan origin. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **28**: 112-117.
- Oscarson, S. y Sehgelmeble, F.W. 2002. Chemical Syntheses of Inulin and Levan Structures. *J Org Chem.* **67**: 8457-8462.
- Patel, V., Saunders, G. y Bucke, C. 1997. N-deglycosylation of fructosyl-transferase and invertase from *Fusarium oxysporum* decreases stability but has little effect on kinetics and synthetic specificity. *Biotechnol Lett.* **19**: 75-77.

- 
- Pons, T., Hernández, L., Batista, F. y China, G. 2000. Prediction of a common  $\beta$ -propeller catalytic domain for fructosyltransferases of different origin and substrate specificity. *Protein Sci.* **9**: 2285-2291.
- Probert, H.M. y Gibson, G.R. 2002. Investigating the prebiotic and gas- generating effects of select carbohydrates on the human colonic microflora. *Lett Appl Microbiol.* **35**: 473-480.
- Rao, C., Chou, D., Simi, B., Ku, H. y Reddy, B. 1998. Prevention of colonic aberrant crypt foci and modulation of large bowel microbial activity by dietary coffee fiber, inulin and pectin. *Carcinogenesis.* **19**: 1815-1819.
- Reddy, B.S. 1999. Possible Mechanisms by Which Pro- and Prebiotics Influence Colon Carcinogenesis and Tumor Growth. *J Nutr.* **129**: 1478S-1481S.
- Rehm, J., Willmitzer y Heyer, A. 1998. Production of 1-kestose in transgenic yeast expressing a fructosyltransferase from *Aspergillus foetidus*. *J Bacteriol.* **180**: 1305-1310.
- Ritsema, T. y Smeekens, S, 2003. Fructans: beneficial for plant and humans. *Curr Opin Plant Biol.* **6**: 223-230.
- Roberfroid, M.B. 1999 a. Nutritional and Health Benefits of Inulin and Oligofructose. Concepts in functional foods: The case of inulin and oligofructose. *J Nutr.* **129**: 1398S-1401S.
- Roberfroid, M.B. 1999 b. Nutritional and Health Benefits of Inulin and Oligofructose. Caloric Value of Inulin and Oligofructose. *J Nutr.* **129**: 1436S-1437S.
- Roberfroid, M.B. 2000. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am J Clin Nutr.* **71**: 1682S-7S.
- Roberfroid, M.B. 2002. Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose. *Br J Nutr.* **87**: S139- S143.
- Shiroza, T. and Karamitsu. 1988. Sequence analysis of the *Streptococcus mutans* fructosyltransferase gene and flanking regions. *J Bacteriol.* **170**: 810-816.
- Song, D. y Jacques, A. 1999. Purification and enzymic properties of fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *Biochem J.* **341**: 285-291.
- Steinberg, D., Rozen, R., Bromshteym, M., Zaks, B., Gedalia, I. y Bachrach, G. 2002. Regulation of fructosyltransferase activity by carbohydrates, in solution and immobilized on hydroxyapatite surfaces. *Carbohydr Res.* **337**: 701-710.

---

Tanaka, T., Yamamoto, S., Oi, S., y Yamamoto, T. 1981. Structure of heterooligosaccharides synthesized by levansucrase. *J Biochem.* **90**: 521-526.

Van Hijum, S.A.F.T., van der Maarel, M.J.E.C. y Dijkhuizen, L. 2002. Kinetics properties of an inulosucrase from *Lactobacillus reuteri* 121. *FEBS Lett.* **534**: 207-210.

Van Loo, J., Coussement, P., De Leenher, L., Hoebregs, H. y Smits, G. 1995. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **35**: 525-552.

Vijn, I. y Smeekens, S. 1999. Fructan: More Than a Reserve of Carbohydrate? *Plant Physiol.* **120**: 351-359.

Wada, T., Ohguchi, M. y Iwai, Y. 2003. A novel enzyme of *Bacillus* sp. 217C-11 that produces Inulin from sucrose. *Biosci Biotechnol Biochem.* **67**: 1327-1334.