



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOQUIMICAS**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE INGENIERIA CELULAR Y BIOCATALISIS

**Caracterización de la Hidrólisis Enzimática de
Fructanas**

T E S I S

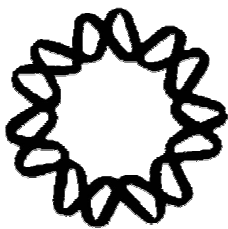
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

I.B.Q. Iván Muñoz Gutiérrez

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Agustín López-Munguía Canales



CUERNAVACA, MORELOS 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

A mamá

Este trabajo fue realizado 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 y el apoyo técnico de la M. C. María Elena Rodríguez Alegría.

Durante la realización de los estudios de Maestría, se contó con una beca del Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro 204386.

El proyecto fue financiado por el Comité Técnico del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con clave IN228006-3 y por FOMIX-CONACYT con número de registro 80360.

“La verdad que yo venero, es la modesta verdad de la ciencia, la verdad relativa, fragmentaria, provisoria, siempre sujeta a retoque, a corrección, a arrepentimiento, la verdad a nuestra escala; por el contrario, yo dudo y odio la verdad absoluta, la verdad total y definitiva, la verdad con una gran V, que es la base de todos los sectarismos, de todos los fanatismos, y de todos los crímenes”

Jean Rostand

**CARACTERIZACIÓN DE
LA HIDRÓLISIS
ENZIMÁTICA DE
FRUCTANAS**

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	II
ABREVIACIONES	III
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. GENERALIDADES	9
3.1. Origen de las fructanas.....	9
3.2. Estructura de las fructanas.....	11
3.3. Aplicaciones de las fructanas.....	12
3.4. Hidrólisis de fructanas.....	14
3.5. Cuantificación y determinación de fructanas presentes en plantas y alimentos, así como las producidas por microorganismos.....	17
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVO GENERAL	20
6. OBJETIVOS PARTICULARES	20
7. MATERIALES Y MÉTODOS	22
7.1. Sustratos.....	22
7.2. Clonación y expresión heteróloga del gen <i>bfrA</i> de <i>T. maritima</i> en <i>E. coli</i>	23
7.3. Zimogramas y tinción con reactivo de Schiff.....	25
7.4. Análisis enzimático.....	27
7.5. Análisis de los productos de finales de reacción de las distintas fructanas a 24 y 48 h por HPLC.....	28
7.6. Determinación del PM de las fructanas.....	28
7.7. Cálculo de parámetros cinéticos.....	30
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
8.1. Determinación del PM promedio de las fructanas bacterianas y agavina.....	34
8.2. Análisis del proceso de hidrólisis de fructanas mediante Fructozyme L.....	35
8.2.1. Zimogramas.....	35
8.2.2. Hidrólisis de fructanas mediante Fructozyme L.....	36
8.2.3. Conversión alcanzada en las reacciones de hidrólisis de distintas fructanas con Fructozyme L.....	42
8.2.4. Productos de la degradación de fructanas con Fructozyme L.....	43
8.3. Análisis de hidrólisis de fructanas mediante la BfrA.....	49
8.3.1. Amplificación y Clonación del gen <i>BfrA</i> de la bacteria <i>T. maritima</i> en <i>E. coli</i>	49
8.3.2. Zimogramas.....	49
8.3.3. Hidrólisis de fructanos mediante la BfrA.....	50
CONCLUSIONES	58
BIBLIOGRAFÍA	62
AGRADECIMIENTOS	75
ANEXO	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ejemplos de diferentes tipos de fructanas.....	3
Figura 2	Zimograma realizado con A) inulina de achicoria y B) levana de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B-512F para observar la actividad de Fructozyme L	35
Figura 3	Cinéticas de hidrólisis de fructanas y sacarosa usando Fructozyme L.	36
Figura 4	Ajuste de las cinéticas de hidrólisis de fructanas bacterianas mediante Fructozyme L a los modelos de Michaelis-Menten (M-M) y Primer Orden (PO).....	38
Figura 5	Determinación de las constantes de velocidad de primer orden de las fructanas de origen bacteriano hidrolizadas usando a Fructozyme L a diferentes concentraciones de sustrato.....	39
Figura 6	Análisis del porcentaje de hidrólisis a 24 horas de reacción de distintas fructanas usando Fructozyme L.....	42
Figura 7	Análisis de la distribución de PM de fructanas hidrolizadas mediante Fructozyme L en columna Ultrahydrogel-Linear.....	44
Figura 8	Análisis de la formación de oligosacáridos de fructanas hidrolizadas mediante Fructozyme L en columna C18.....	46
Figura 9	Análisis de la formación de oligosacáridos de (A) inulina de <i>L. citreum</i> CW28 y (B) levana de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B-512F hidrolizadas mediante Fructozyme L en la columna C18.....	48
Figura 10	Gel que muestra los productos de la PCR en colonia.....	50
Figura 11	Zimograma realizado con inulina de <i>L. citreum</i> CW28 para observar la actividad de la BfrA.....	50
Figura 12	Cinéticas de hidrólisis de fructanas y sacarosa usando la BfrA.....	51
Figura 13	Determinación de las constantes de velocidad de primer orden de las fructanas de origen bacteriano hidrolizadas usando la BfrA.....	52
Figura 14	Ajustes de las cinéticas de hidrólisis de fructanas bacterianas mediante la BfrA a los modelos de Michaelis-Mente (M-M) y Primer Orden (PO).....	52
Figura 15	Análisis del porcentaje de hidrólisis a 24 horas de reacción de distintas fructanas usando la BfrA.....	54
Figura 16	Análisis de la distribución de pesos moleculares de fructanas hidrolizadas mediante la BfrA en columna Ultrahidrogel-Linear.....	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I	Contenido de inulina en plantas de consumo humano.....	9
Tabla II	Composición de la piña en especies de plantas de agave.	10
Tabla III	Bacterias ácido lácticas productoras de fructanas.....	10
Tabla IV	Bacterias no ácido lácticas productoras de fructanas.....	11
Tabla V	Microorganismos productores de fructanohidrolasas.....	16
Tabla VI	Programa empleado para la amplificación del gen <i>BfrA</i> mediante la PCR.....	24
Tabla VII	Condiciones de reacción para los ensayos enzimáticos.....	27
Tabla VIII	Fructanas empleadas en el proceso de hidrólisis enzimática.....	27
Tabla IX	PM y GP promedio de fructanas empleadas durante la experimentación.....	34
Tabla X	Parámetros cinéticos de sacarosa y fructanas vegetales hidrolizadas por Fructozyme L estimados mediante la representación gráfica de Lineweaver-Burk del modelo de Michaelis-Menten.....	37
Tabla XI	Comparación de constantes de velocidad de reacción usando Fructozyme L para hidrolizar diversas fructanas.....	41
Tabla XII	Parámetros cinéticos de sacarosa e inulina de achicoria hidrolizados por la BfrA calculados usando la representación gráfica de Lineweaver-Burk del modelo de Michaelis-Menten.....	53
Tabla XIII	Parámetros cinéticos de sacarosa e inulina hidrolizados por la BfrA reportados por Liebl y col.....	53
Tabla XIV	Comparación de constantes de velocidad de reacción usando la BfrA para hidrolizar diversas fructanas.....	54

ABREVIACIONES

BALs	Bacterias ácido lácticas
BfrA	Exoinulinasa de <i>Thermotoga maritima</i>
GC	Cromatografía de gases
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
MS	Espectrometría de masas
FOS	Fructooligosacáridos
GP	Grado de polimerización
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
k'	Constante de velocidad de primer orden
k''	Constante de velocidad de segundo orden
K_m	Constante de Michaelis
PECs	Polisacáridos extracelulares
PM	Peso molecular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
NMR	Resonancia magnética nuclear
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida en presencia de SDS
V_{max}	Velocidad máxima de hidrólisis

RESUMEN

1. RESUMEN

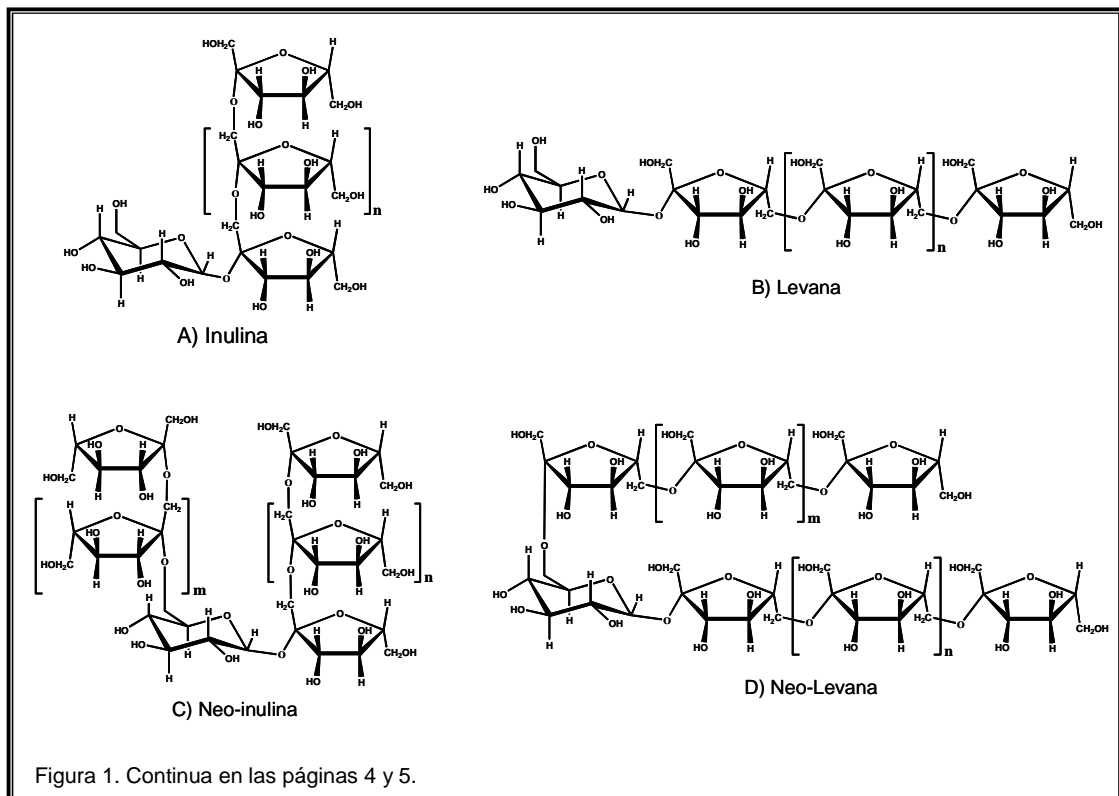
Es sabido que varias fructofuranosidasas, particularmente $\text{exo-}\beta\text{-fructosidasas}$, pueden hidrolizar inulina, levana y fructanas mezcladas como las agavinas (fructanas presentes en plantas de agave). En este contexto, la habilidad de las fructosidasas para hidrolizar diferentes tipos de fructanas se comparó usando dos preparaciones enzimáticas: Fructozyme L (Novozymes), un producto comercial formado por una mezcla de endo y exoinulinasas, y una exoinulinaasa (BfrA) de la bacteria *T. maritima*.

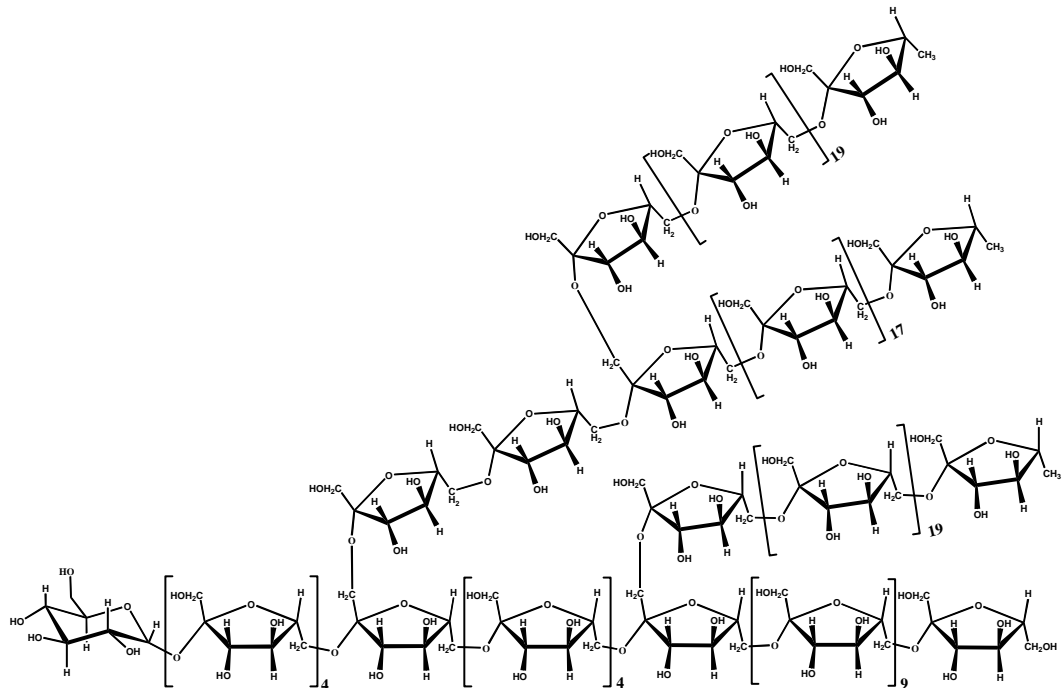
Como fue esperado, ambos productos enzimáticos hidrolizaron preferentemente enlaces $\beta\text{-}2\text{-}1$ y fructanas de bajo peso molecular. La inulina de achicoria fue el sustrato degradado con mayor velocidad por ambas preparaciones, seguido por la inulina bacteriana que posee un peso molecular alto y esta ramificada en posiciones $\beta\text{-}2\text{-}6$, mientras que las levanas bacterianas fueron hidrolizadas más lentamente. Se encontró que la hidrólisis de la sacarosa y las fructanas de bajo peso molecular (≤ 8.3 kDa) siguió una cinética tipo Michaelis-Menten con ambas preparaciones enzimáticas, mientras que la hidrólisis de fructanas de alto peso molecular ($\geq 2,200$ kDa) siguió una cinética de primer orden. De la comparación de las constantes de segundo orden se encontró que la inulina bacteriana (*L. citreum* CW28) fue hidrolizada a una velocidad 15 y 11 veces menor con Fructozyme L y la BfrA respectivamente, relativo a la inulina de achicoria. Para el caso de la levana de *L. mesenteroides* NRRL B-512F, la constante de segundo orden fue 200 y 22 veces menor que la inulina de achicoria con las mismas preparaciones enzimáticas. Además de la información encontrada acerca de la cinética de hidrólisis de fructanas, estos resultados también sugieren que el comportamiento cinético puede emplearse para diferenciar entre fructanas con diferentes estructuras. Los resultados obtenidos fueron sometidos para su publicación en la revista Journal of Food Chemistry con el título: Enzymatic hydrolysis of fructans by two $\beta\text{-fructosidase}$ preparations, anexo al final del escrito.

INTRODUCCIÓN

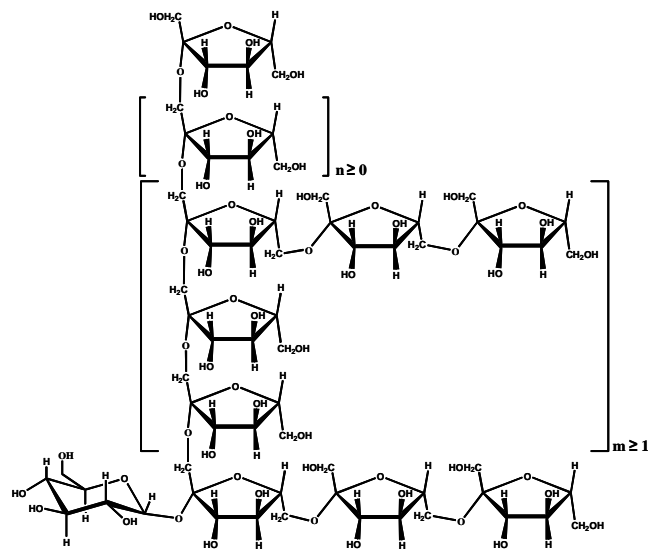
2. INTRODUCCIÓN

Las fructanas son polímeros de fructosa sintetizadas a partir de la sacarosa que dependiendo del tipo de enlace que las une se pueden clasificar en: (A) inulina, formada por enlaces β 2-1; (B) levana, formada por enlaces β 2-6; (C) neo-inulina, formada por dos cadenas de inulina unidas a una molécula de glucosa, en sus carbonos uno y seis; (D) neo-levana, formada por dos cadenas de levana unidas a una molécula de glucosa, igualmente en sus carbonos uno y seis [1-3] (figura 1). La inulina puede estar ramificada con enlaces β 2-6 y la levana con enlaces β 2-1 generando estructuras más complejas (figura 1E). En algunos casos ninguno de los dos tipos de enlaces predomina por lo que es difícil considerar a la fructana como inulina o levana, recibiendo el nombre de fructanas mezcladas (figuras 1F y 1G), siendo el caso de las fructanas presentes en las plantas de agave, las cuales han sido denominadas agavinas [4].



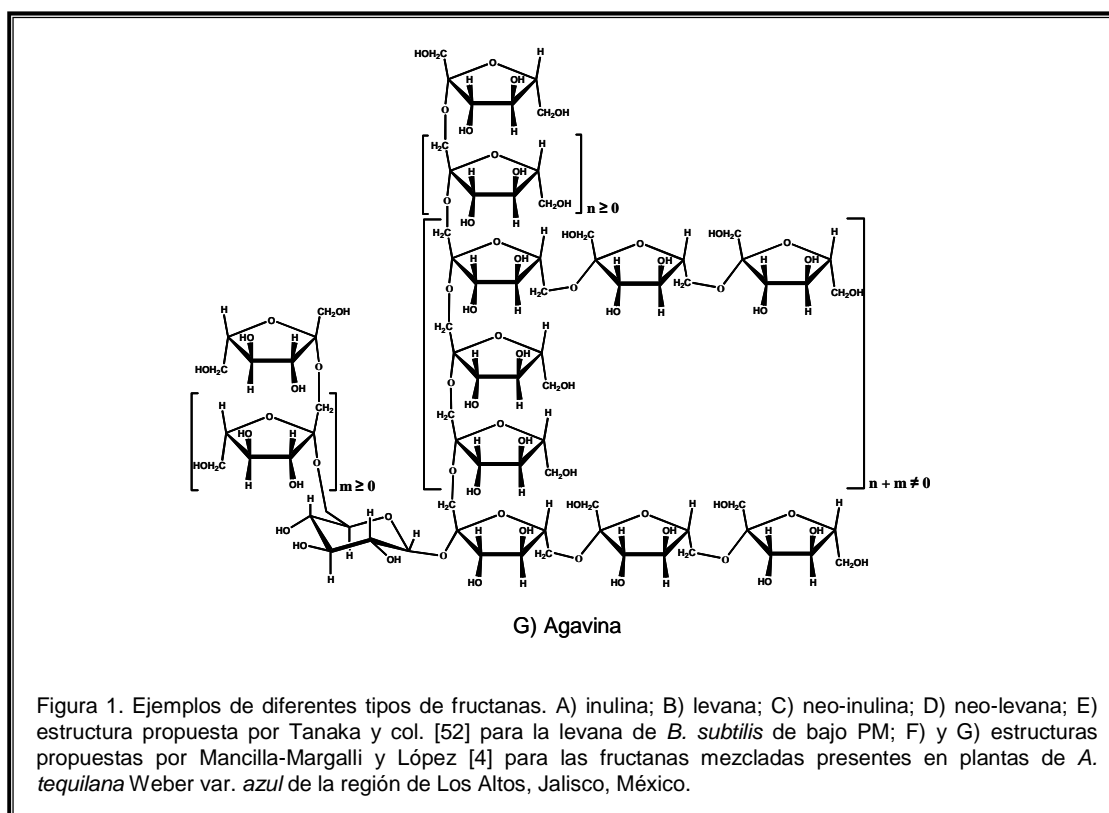


E) Levana ramificada de *Bacillus subtilis*



F) Graminan

Figura 1. Continúa en la página 5.



Alrededor del 15% de las plantas con flores utilizan fructanas como reserva de carbohidratos [5], dentro de las cuales se encuentran la achicoria, la alcachofa de Jerusalén, la dalia y las plantas de agave. Entre los microorganismos productores de fructanas se encuentran las bacterias ácido lácticas (BALs) de los géneros *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Weissella*, así como algunas especies no ácido lácticas como *Zymomonas mobilis*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus polymyxa* [6].

El interés por la inulina y los fructoligosacáridos (FOS) con enlaces $\beta(2-1)$, ha crecido debido a las propiedades nutraceuticas y organolépticas que poseen [7-9], mientras que las levanas son estudiadas pues se ha demostrado que tienen actividad antitumoral [10,11], así como actividad antiinflamatoria e hidratante sobre piel irritada [12]. Además, las fructanas representan una fuente importante para la producción de fructosa [13,14], azúcar con un poder edulcorante mayor que la sacarosa y que exhibe múltiples propiedades funcionales cuando se usa en alimentos y bebidas [15]. La

producción de inulina y FOS se ha realizado hasta ahora principalmente mediante su extracción de plantas de achicoria [8], mientras que en nuestro país, las fructanas presentes en las plantas de diversos tipos de agave y sotol han sido utilizadas casi exclusivamente para la producción de bebidas fermentadas tradicionales como el tequila [16,17], mezcal [18,19], bacanora [20] y sotol [21].

La hidrólisis de fructanas para la producción de FOS y fructosa es llevada a cabo enzimáticamente por las fructanohidrolasas, enzimas que pueden ser de origen vegetal o microbiano. Las endoinulinasas (EC 3.2.1.7), fructanohidrolasas que hidrolizan enlaces internos de la inulina, han sido ampliamente estudiadas para la producción de FOS a partir de inulinas de origen vegetal [22-24], mientras que las exoinulinasas, fructanohidrolasas que hidrolizan enlaces terminales de los extremos no reductores de inulina y levana, han sido estudiadas solas o en sinergismo con las endoinulinasas en la hidrólisis de inulina vegetal para la producción de fructosa [25-28]. Además del interés generado por la demanda de FOS y fructosa, las inulinasas han despertado el interés de grupos de investigación, incluido el nuestro, pues son un auxiliar en la identificación de fructanas al poder modificarlas en un medio por hidrólisis selectiva y su posterior cuantificación mediante fructosa y/o poder reductor.

Diversos autores han reportado fructanohidrolasas eficientes para la producción de fructosa, siendo las levaduras del género *Kluyveromyces* y los hongos del género *Aspergillus* las fuentes más versátiles para la producción de inulinasas [29], y el producto comercial Fructozyme L (Novozymes) compuesto por una mezcla de endo y exoinulinasas de *Aspergillus niger*, el más estudiado y aplicado en la industria actualmente [25,27,30]. En términos de su estabilidad y condiciones de operación, las enzimas de *Aspergillus* resumen las características apropiadas para una aplicación comercial. Sin embargo, dado que el producto final es susceptible de contaminación, es conveniente trabajar a temperaturas suficientemente altas para disminuir los riesgos. En este sentido destaca otra inulinasa, la exoinulinasa de *T. maritima* (BfrA) que es la β -fructosidasa más termoestable reportada hasta la fecha [31], por lo que resulta atractiva para un proceso de esta naturaleza.

Dado los antecedentes de trabajo experimental del grupo, hemos encontrado que si bien las inulinasas actúan preferentemente sobre las inulinas, también las levanas son susceptibles de hidrólisis por estas enzimas, variando las características cinéticas con las que se lleva a cabo el proceso. Por esta razón hemos decidido estudiar el proceso cinético de hidrólisis aplicando tanto un producto comercial disponible (Fructozyme L) así como una exoinulinasa termorresistente (BfrA) que permita no solo realizar un análisis comparativo, sino también explorar la posibilidad de su aplicación en procesos de hidrólisis. Por otro lado, la determinación de la estructura de una fructana requiere de procedimientos finos y complejos como resonancia magnética nuclear (NMR) o análisis por metilación de los grupos hidroxilo mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) [32], por lo que contar con métodos rápidos que permitan obtener una idea inicial de la estructura sería de gran utilidad en la investigación y caracterización de fructanas. Por lo antes expuesto, el objetivo del presente trabajo consiste en una primera instancia, caracterizar cinéticamente la hidrólisis de diversas fructanas empleando un producto enzimático comercial (Fructozyme L) y una exoinulinasa de la bacteria hipertermofílica *T. maritima* (BfrA), y a partir de estos resultados, analizar la posibilidad de identificar la estructura de las fructanas o cambios estructurales en las mismas mediante un ensayo enzimático.

GENERALIDADES

3. GENERALIDADES

3.1. Origen de las fructanas

Las fructanas son sintetizadas principalmente por plantas y bacterias. En el caso de las plantas, alrededor del 15% de las Angiospermas (plantas con flores) utilizan a las fructanas como carbohidratos de reserva [5]. Éstas son sintetizadas y almacenadas en la vacuola y acumuladas en órganos especializados como en la raíz de la achicoria, el tubérculo de la alcachofa de Jerusalén, el bulbo de la cebolla (tabla I) o la piña en las plantas de agave (tabla II) [1,33]. Un rol diferente de las fructanas en plantas es la posibilidad de que funcionen de forma protectora durante el estrés causado por la sequía, la sal y/o el frío [1].

Fuente	Parte comestible	Contenido de inulina (% peso fresco)
Cebolla	Bulbo	2-6
Alcachofa de Jerusalén	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

[†] Valor estimado.

Por otro lado, la producción de polisacáridos extracelulares (PECs) como las fructanas, está ampliamente distribuida entre las BALs que han sido utilizadas por siglos para la obtención de productos fermentados (tabla III). Además de las BALs existen otras bacterias como las que se enlistan en la tabla IV, capaces de producir fructanas. Se ha

propuesto que la función de los PECs bacterianos es de protección contra la desecación, la fagocitosis, la depredación por protozoos, el ataque de fagos, antibióticos, toxinas y estrés osmótico. Los PECs también tienen un rol importante en el reconocimiento celular, adhesión a superficies y formación de biofilms facilitando de esta forma la colonización de varios ecosistemas [35].

Tabla II. Composición de la piña en especies de plantas de agave. Piñas de plantas con edades de 8 a 9 años. Resultados expresados en % en peso [36].

Nombre común	H ₂ O	Fibra Cruda	Agavina	Azúcares reductores totales	Nitrógeno	Cenizas	pH
Carpintero	70	11	15.4	1.03	0.021	3.9	5.5
Pata de mula	63	12	19.8	1.00	0.019	2.9	5.0
Bermejo	65	12.5	18.1	1.06	0.022	2.5	5.0
Azul	62	11.8	20.1	1.03	0.024	2.5	5.5
Zopilochino	70	12	14.3	1.03	0.023	2.7	4.5
Sihuín	65	12.5	17.5	1.09	0.021	2.5	4.5
Chato	68	12.5	15.6	1.23	0.020	2.4	5.0
Azul 2	60	11	24.1	1.50	0.020	2.7	4.5

Tabla III. Bacterias ácido lácticas productoras de fructanas.

Microorganismo	Tipo de fructana	Referencia
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ND [†]	[37]
<i>Lactobacillus crispatus</i>	ND	[37]
<i>Lactobacillus frumenti</i>	ND	[38]
<i>Lactobacillus mucosae</i>	ND	[37]
<i>Lactobacillus panis</i>	ND	[38]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	ND	[39]
<i>Lactobacillus ponéis</i>	ND	[38]
<i>Lactobacillus reuteri</i>	ND	[38]
<i>Lactobacillus reuteri</i> 121	Inulina y Levana	[40,41]
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> ,	ND	[38]
<i>L. sanfranciscensis</i> LTH1729 y <i>L. sanfranciscensis</i> LTH2590	Levana	[42]
<i>Leuconostoc citreum</i> CW28	Inulina	[43]
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ATCC 8293	Levana	[44]

Tabla III. Continuación

<i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-512F	Levana	[45]
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Levana	[39]
<i>Streptococcus mutans</i>	Inulina	[46]
<i>Streptococcus salivarius</i>	Levana	[46]
<i>Weissella cibaria</i>	ND	[39]
<i>Weissella confusa</i>	ND	[38]

† ND – Estructura no determinada.

Tabla IV. Bacterias no ácido lácticas productoras de fructanas

Microorganismo	Tipo de fructana	Referencia
<i>Acetobacter diazotrophicus</i> SRT4	Levana	[47]
<i>Actinomyces viscosus</i>	Levana	[48]
<i>Aerobacter levanicum</i>	Levana	[49]
<i>Bacillus circulans</i>	Levana	[50]
<i>Bacillus polymyxa</i>	Levana	[51]
<i>Bacillus subtilis</i>	Levana	[52]
<i>Bacillus subtilis</i> (Natto) Takahashi	Levana	[53]
<i>Bacillus sp</i> 217C-11	Inulina	[54]
<i>Erwinia amylovora</i>	Levana	[55]
<i>Microbacterium laevaniformans</i>	Levana	[56]
<i>Pseudomonas aurantiaca</i>	Levana	[57]
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Phaseolicola</i>	Levana	[58]
<i>Rahnella aquatilis</i> JCM-1683	Levana	[59]
<i>Zymomonas mobilis</i>	Levana	[60]

3.2. Estructura de las fructanas

La estructura de las fructanas varía dependiendo de su origen. En plantas, la inulina se encuentra en las Asterales como la achicoria y la alcachofa de Jerusalén [61] (figura 1). La levana está presente en algunos pastos (Poaceae) como en *Poa ampla* [62], la neo-inulina se produce en las Liliaceae como el espárrago y la cebolla [63,64], la neo-levana se encuentra en las Poales como en la avena [65] y finalmente las fructanas mezcladas o “gramminans” están presentes también en avena, *Agave spp* y *Dasyilirion spp* [4,65].

Las bacterias producen principalmente levanas o inulinas ramificadas (figura 1, tabla III y IV), cuyo grado de polimerización (GP) puede alcanzar los 100,000 residuos de fructosa, mientras que las plantas producen toda una gama de estructuras de fructanas con un GP que varía entre los 30-50 residuos de fructosa y que ocasionalmente alcanza los 200 [2].

La elucidación de la estructura química de carbohidratos complejos como las fructanas se lleva a cabo mediante instrumentación sofisticada como NMR y MS. Sin embargo, un análisis de metilación de los grupos hidroxilo obtenido mediante GC-MS es requerida para obtener información acerca de la posición de los enlaces glicosídicos, posición de ramificaciones, composición de los monosacáridos y tamaño de los anillos [32]. Este proceso consiste básicamente en la per-*O*-metilación del polisacárido seguido de una hidrólisis ácida que proporciona monosacáridos parcialmente metilados, su reducción a sus correspondientes alditoles, la acetilación de los nuevos grupos hidroxilo formados y finalmente su análisis mediante GC-MS [32].

3.3. Aplicaciones de las fructanas

Las fructanas poseen diversas aplicaciones que dependen de su estructura y su peso molecular (PM). Debido al tipo de enlace que poseen no pueden ser hidrolizadas por las enzimas del sistema digestivo humano, por lo que resisten el paso por el estómago hasta llegar al colon donde son fermentadas por la microbiota intestinal. Esto ha permitido clasificar a las fructanas tipo inulina como prebióticos, ya que además de no ser hidrolizadas por los ácidos gástricos y las enzimas humanas, y no ser absorbidas por el tracto gastrointestinal, son fermentadas por la flora benéfica del intestino estimulando su crecimiento y/o actividad, lo que contribuye a la buena salud del hospedero [7-9]. Diversos estudios realizados con inulina *in vivo* e *in vitro*, han demostrado su capacidad para estimular el crecimiento de las bifidobacterias [66-69], microorganismos asociados con el buen funcionamiento del ciego y colon, además, se ha encontrado que una dieta rica en inulina incrementa la producción de butirato durante su fermentación [66,68], principal fuente de energía para los colonocitos (células epiteliales ciego-colónicas).

Por otro lado, dependiendo del GP, la inulina y sus FOS poseen distintos atributos funcionales. Por ejemplo, la inulina tiene la habilidad de formar microcristales cuando se mezcla con agua o con leche, formando texturas suaves y cremosas por lo que puede ser utilizada como sustituto de grasa en alimentos [7], mientras que los FOS, al tener cadenas pequeñas, son más solubles que la inulina y ayudan a dar mejor cuerpo a los productos lácteos, disminuir el punto de congelamiento de postres y dar textura a productos de panadería, además, poseen de un 30 a un 50% de dulzura comparada con la sacarosa [7], siendo la planta de achicoria la principal fuente para la producción de inulina y FOS [8].

El estudio de las fructanas mezcladas y levanas en aplicaciones farmacológicas ha sido amplio. *Ophiopogon japonicus* y *Cyathula officinalis* Kuan son plantas usadas como medicamentos en la cultura tradicional china. Estudios farmacológicos de los polisacáridos presentes en *O. japonicus* muestran su capacidad para estimular la proliferación de linfocitos [70], mientras que se ha demostrado que los polisacáridos presentes en *C. officinalis* poseen actividad antitumoral [71]. La estructura de estos polisacáridos fue determinada mostrando que son fructanas del tipo fructana mezclada. En lo referente a las levanas, se ha encontrado que también poseen capacidad antitumoral [72,73], y que características estructurales como el GP [11] y el PM [12,56,72] juegan un papel importante para tal efecto. Esto sugiere que la composición del polímero, el tipo de enlace glicosídico y el porcentaje de ramificación influyen la estructura secundaria y terciaria de la cadena principal y su ensamblaje macromolecular, definiendo de esta forma las propiedades biológicas y físicas de la fructana [56]. También se ha encontrado un potencial de las levanas en la industria cosmética al observar sus efectos hidratantes y antiinflamatorios sobre piel irritada [12].

Las BALs han sido utilizadas por siglos para la producción de alimentos fermentados debido a las propiedades de conservación y de sabor que les confieren a estos productos. Otra característica importante de algunas de estas cepas es su habilidad para la síntesis de PECs como las fructanas (tabla III). Durante la producción tradicional de pan mediante masa madre (sourdough), la masa es fermentada por un cultivo simbiótico de levaduras y BALs que además de mejorar el aroma y la vida de anaquel

producen PECs que afectan positivamente la reología de la masa y la textura del pan. Se han realizado estudios sobre BALs procedentes de masa madre (sourdough) encontrando una gran variedad que produce fructanas durante la fermentación [38,39]. La producción *in situ* de PECs como las fructanas durante la fermentación del pan, permite además evitar el uso de aditivos durante el proceso.

Otro aspecto de interés industrial, es el hecho de que las fructanas representan una fuente importante para la producción de fructosa [13,14], azúcar que en forma cristalina exhibe un poder edulcorante relativo al de la sacarosa de 1.8 y en solución de entre 1-1.75 dependiendo de la temperatura, pH y concentración [74,75]. Además, la dulzura de la fructosa es mayor a bajas temperaturas, incrementándose 1.8 veces cuando la temperatura se reduce de 60 a 5°C [75], lo cual repercute de manera importante en su aplicación en la industria refresquera.

En nuestro país, las fructanas presentes en las plantas de agave y sotol ostentan una gran importancia, ya que mediante su hidrólisis y fermentación se obtienen bebidas espirituosas tradicionales como el tequila [16,17], mezcal [18,19], bacanora [20] y sotol [21]. Por otro lado, la producción de las denominadas “mieles de agave” derivadas de las agavinas son una alternativa de edulcorante con grandes beneficios nutricionales y fisiológicos [76].

3.4. Hidrólisis de fructanas

La hidrólisis de fructanas para la producción de fructosa y FOS se lleva a cabo enzimáticamente por las fructanohidrolasas que, como se señaló, pueden ser de origen vegetal o microbiano. Las de origen microbiano se pueden clasificar en tres grupos distintos, de acuerdo con la clasificación propuesta por Avigad y Bauer [77]:

- A. β -Fructofuranosidasas inespecíficas, que además de hidrolizar la sacarosa son capaces de hidrolizar, a partir del extremo no reductor, fructósidos y fructanas en las que la fructosa está unida mediante enlaces tanto β 2-1 como β 2-6: a

este grupo pertenecen las Exo- β -D-fructosidasas (exoinulinasas o exolevanasas) (EC 3.2.1.80) y las 2,6- β -fructan 6-levanbiohidrolasas (3.2.1.64).

- B. Endoinulinasas (EC 3.2.1.7), enzimas específicas para la hidrólisis de enlaces internos β 2-1 de inulinas.
- C. Endolevanasas (EC 3.2.1.65), enzimas específicas para la hidrólisis de enlaces internos β 2-6 de levanas.

En el caso de las fructanohidrolasas de origen vegetal, únicamente se conocen Exo- β -D-fructosidasas, pero debido a que éstas presentan una alta especificidad por los enlaces β (2-1) o β (2-6) y baja o nula actividad invertasa [78] se agrupan en: (a) fructan β -(2-1)-fructosidasas (EC 3.2.1.153) y (b) fructan β -(2-6)-fructosidasas (EC 3.2.1.154).

La búsqueda de fructanohidrolasas para su aplicación en la producción de fructosa y FOS ha sido amplia, como se resume en la tabla V, en la que se presentan referencias de enzimas de diversos orígenes. También ha sido amplio el estudio de la hidrólisis de inulina vegetal para la producción de fructosa, planteada como una alternativa a la producción clásica de fructosa a través de la hidrólisis del almidón de maíz y la isomerización de glucosa [25-28]. Sin embargo, dado que la inulina presenta baja solubilidad a temperatura ambiente y el producto final es susceptible de contaminación, el proceso industrial para la producción de fructosa y FOS de inulina se lleva a cabo a 60°C, lo que requiere de enzimas que posean una buena actividad y estabilidad a esta temperatura. Diversos autores han reportado enzimas eficientes para este fin, siendo las inulinasas de *Kluyveromyces* ssp y *Aspergillus* spp las mejor conocidas [29] y el producto comercial Fructozyme L (Novozymes) compuesto por una mezcla de endo y exoinulinasas de *Aspergillus niger* el más empleado actualmente [25,27,30]. En términos generales estas enzimas resumen las características apropiadas para una aplicación comercial, teniendo propiedades adecuadas para su uso industrial. Por otro lado, dada la necesidad de trabajar a altas temperaturas es importante señalar que hasta la fecha, la BfrA es la inulinasa más termoestable y termoactiva reportada [31], por lo que resulta atractiva para este proceso.

Tabla V. Microorganismos productores de fructanohidrolasas.

Microorganismo	Tipo de enzima	Temperatura [†] (°C)	Referencia
<i>Aspergillus awamori</i>	Exo-β-D-fructosidasa	60	[79]
<i>Aspergillus candidus</i>	Exo-β-D-fructosidasa	45	[80]
<i>Aspergillus ficuum</i>	Exo-β-D-fructosidasa	ND [‡]	[81]
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Exo-β-D-fructosidasa	60	[82]
<i>Aspergillus niger</i>	Exo-β-D-fructosidasa	ND	[28]
<i>Aspergillus oryzae</i>	Exo-β-D-fructosidasa	55	[83]
<i>Bacillus polymyxa</i>	Exo-β-D-fructosidasa	35	[84]
<i>Bacillus sphaericus</i> 188-1	Exo-β-D-fructosidasa	40	[85]
<i>Bacillus subtilis</i>	Exo-β-D-fructosidasa	55	[86]
<i>Bacillus subtilis</i> 430 ^a	Exo-β-D-fructosidasa	ND	[87]
<i>Bacteroides fragilis</i> BF-1	Exo-β-D-fructosidasa	37	[88]
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> G1	Exo-β-D-fructosidasa	ND	[89]
<i>Bifidobacterium infantis</i>	Exo-β-D-fructosidasa	55	[90]
<i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC 15697	Exo-β-D-fructosidasa	37	[91]
<i>Bifidobacterium lactis</i> DSM10140(T)	Exo-β-D-fructosidasa	40	[92]
<i>Candida guilliermondii</i>	Exo-β-D-fructosidasa	ND	[28]
<i>Chrysosporium cladosporioides</i>	Exo-β-D-fructosidasa	55	[93]
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> KP1289	Exo-β-D-fructosidasa	60	[94]
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> SRT4	Exo-β-D-fructosidasa	30	[95]
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CDBB-L-278	Exo-β-D-fructosidasa	50	[96]
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556	Exo-β-D-fructosidasa	50	[97]
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>Bulgaricus</i>	Exo-β-D-fructosidasa	55	[98]
<i>Kluyveromyces marxianus</i> and <i>K. lactis</i>	Exo-β-D-fructosidasa	ND	[99]
<i>Lactobacillus pentosus</i>	Exo-β-D-fructosidasa	25	[100]
<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> P 4134	Exo-β-D-fructosidasa	ND	[101]
<i>Penicillium janczewskii</i>	Exo-β-D-fructosidasa	55	[102]
<i>Penicillium</i> sp Strain TN-88	Exo-β-D-fructosidasa	55	[103]
<i>Pichia guilliermondii</i>	Exo-β-D-fructosidasa	ND	[104]
<i>Pseudomonas mucidolens</i>	Exo-β-D-fructosidasa	55	[105]
<i>Scytalidium acidophilus</i>	Exo-β-D-fructosidasa	ND	[106]
<i>Streptococcus mutans</i>	Exo-β-D-fructosidasa	ND	[107]
<i>Streptomyces</i> sp	Exo-β-D-fructosidasa	70	[108]
<i>Thermotoga maritima</i>	Exo-β-D-fructosidasa	90-95	[31]
<i>Microbacterium laevaniformans</i> ATCC 15953	2,6-β-fructan 6-levanbiohidrolasa	30	[109]

Tabla V. Continuación.

<i>Rhodotorula sp</i>	2,6- β -fructan 6-levanbiohidrolasa	40	[110]
<i>Streptomyces exfoliatus</i> F3-2	2,6- β -fructan 6-levanbiohidrolasa	60	[111]
<i>Streptomyces sp</i> No. 7-3	2,6- β -fructan 6-levanbiohidrolasa	40	[112]
<i>Arthrobacter sp</i> S37	Endoinulinasa	50	[113]
<i>Aspergillus ficuum</i>	Endoinulinasa	ND	[81,114]
<i>Aspergillus niger</i>	Endoinulinasa	ND	[28]
<i>Aspergillus niger</i> 20 OSM	Endoinulinasa	55	[24]
<i>Candida guilliermondii</i>	Endoinulinasa	ND	[28]
<i>Chrysosporum pannorum</i>	Endoinulinasa	50	[115]
<i>Penicillium purpurogenum</i>	Endoinulinasa	ND	[116]
<i>Penicillium sp</i> TN-88	Endoinulinasa	50	[117]
<i>Psuedomonas sp</i>	Endoinulinasa	ND	[118]
<i>Xanthomonas oryzae</i> No. 5	Endoinulinasa	50	[119]
<i>Actinomyces viscosus</i> ATCC 19246	Endolevanasa	45	[120]
<i>Arthrobacter sp</i>	Endolevanasa	ND	[77]
<i>Bacillus sp</i> No. 71	Endolevanasa	40	[121]
<i>Bacillus sp</i> 17	Endolevanasa	50	[122]
<i>Streptomyces sp</i> 366L	Endolevanasa	40	[123]

† Temperatura óptima de hidrólisis.

‡ ND. Temperatura no determinada.

3.5. Cuantificación y determinación de fructanas presentes en plantas y alimentos, así como las producidas por microorganismos

Además del interés generado por las fructanohidrolasas por su capacidad para la producción de FOS y fructosa, también han despertado el interés de diversos grupos de investigación, incluido el nuestro, pues son un auxiliar en la identificación de fructanas al poder modificarlas y cuantificarlas en un medio por hidrólisis selectiva mediante fructosa liberada y/o poder reductor [124]. De hecho, la empresa Megazyme ha desarrollado varios kits para la cuantificación de fructanas y FOS en plantas y alimentos que consiste en una primera etapa de hidrólisis enzimática de sacarosa, almidón y maltosacáridos y su

posterior reducción a alditoles, y una segunda etapa en la que se realiza la hidrólisis de fructanas y FOS usando inulinasas, que finalmente se cuantifican mediante la liberación de azúcares reductores [125].

Como antecedentes a este trabajo, en el laboratorio de Biocatálisis en el IBt, hemos encontrado que aunque con diferente especificidad, tanto inulinas como levanas son susceptibles de hidrólisis por inulinasas. Por esta razón hemos decidido caracterizar el proceso de hidrólisis de fructanas empleando tanto un producto enzimático comercial (Fructozyme L, Novozymes) que contiene una mezcla de endo y exoinulinasas así como una exoinulina termorresistente de la bacteria *T. maritima* (BfrA), con el fin de llevar a cabo un análisis comparativo. Por otro lado, como ya se mencionó, la determinación de la estructura en fructanas requiere de procedimientos analíticos finos y complejos como la NMR y el análisis del tipo de enlace de las fructosas mediante metilación de los grupos hidroxilo y posterior cuantificación de los productos de hidrólisis mediante GC-MS [32], por lo que contar con métodos rápidos que den una idea aproximada de la estructura, sería de gran utilidad en la investigación y caracterización de fructanas. Por lo antes expuesto, el objetivo del presente trabajo consiste primeramente en caracterizar cinéticamente la hidrólisis de diversas fructanas empleando dos tipos de catalizadores: Fructozyme L y la BfrA expresada heterológicamente en *Escherichia coli*, y a partir de los resultados cinéticos obtenidos, tratar de definir un método de análisis preliminar de la estructura de una fructana basado en su hidrólisis enzimática, que permita determinar mediante un estudio cinético sencilla, las características de una fructana, y particularmente, diferenciar entre inulinas y levanas. Para cumplir con este objetivo se estudiará el comportamiento cinético del proceso de hidrólisis cuando estos dos catalizadores actúen sobre diversas fructanas.

HIPÓTESIS

Y

OBJETIVOS

4. HIPÓTESIS

La caracterización cinética de la hidrólisis enzimática de fructanas permite diferenciar entre fructanas y tener una idea preliminar sobre su estructura.

5. OBJETIVO GENERAL

Caracterización del proceso de la hidrólisis enzimática de fructanas.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterizar cinéticamente el proceso de hidrólisis enzimática de diferentes fructanas utilizando Fructozyme L.
2. Analizar los productos finales de la reacción de hidrólisis de fructanas empleando Fructozyme L.
3. Expresar el gen *bfrA* que codifica para la exoinulinasa de *T. maritima* en *E. coli*.
4. Caracterizar cinéticamente el proceso de hidrólisis enzimática de diferentes fructanas mediante la BfrA.
5. Analizar los productos finales de la reacción de hidrólisis de fructanas empleando la BfrA.

MATERIALES
Y
MÉTODOS

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Sustratos

Para la caracterización de la hidrólisis enzimática se seleccionaron fructanas de diferentes PM y diferentes características estructurales, dos fructanas de origen vegetal (bajo PM) y cuatro de origen bacteriano (alto PM). Las fructanas de origen bacteriano fueron producidas por microorganismos que han sido estudiados por varios años en nuestro grupo de investigación. Durante la caracterización además de las fructanas se utilizó sacarosa, debido a que, como se mencionó anteriormente las exoinulinas hidrolizan tanto fructanas como sacarosa, asimismo, como se verá más adelante, fue el sustrato empleado como referencia para la determinación de unidades enzimáticas.

Los sustratos empleados durante la experimentación fueron:

- Sacarosa (J. T. Baker, NJ, USA) grado ACS.
- Inulina de achicoria Raftiline HP (Orafti, Tienen, Bélgica) con un GP de 23-60 y PM promedio de 8.3 kDa.
- Agavinas de plantas de *Agave tequilana* Weber var. *azul* extraídas con agua a una relación kg agave/L agua de 1/3 usando agave desgarrado con un diámetro aproximado de partícula de 2 cm y a una temperatura de 60 °C durante 4 horas en agitación a 320 rpm. Posteriormente el extracto se filtró y dializó, para finalmente secarlo mediante liofilización durante 8 horas.
- Inulina de *Leuconostoc citreum* CW28 producida en un trabajo previo por Ortiz-Soto y col [126] utilizando las células completas.
- Levana de *Bacillus subtilis* sintetizada usando un extracto enzimático de la enzima expresada en *E. coli* como fue descrito por Ortiz-Soto y col. [127].

- Levana de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F sintetizada usando un extracto enzimático de la enzima expresada en *E. coli* como fue descrito por Morales-Arrieta y col. [45].
- Levana de *L. mesenteroides* ATCC 8293 sintetizada usando un extracto enzimático de la enzima expresada en *E. coli* como fue descrito por Olvera y col. [44].

Las fructanas microbianas fueron producidas tal como fue descrito en las referencias, se recuperaron por precipitación adicionando dos volúmenes de etanol e incubando a 4 °C toda la noche observándose la formación de un precipitado blanco viscoso (fructana). Posteriormente, el precipitado se disolvió en agua y se dializó, para finalmente secarlo mediante liofilización.

7.2. Clonación y expresión heteróloga del gen *bfrA* de *T. maritima* en *E. coli*

El gen *bfrA* de *T. maritima* que codifica para una β -fructosidasa (invertasa, exoinulinasa) [31], fue amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando ADN cromosomal de *T. maritima* como templado donado por el grupo del Dr. Enrique Morett del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, Morelos).

Los oligonucleótidos diseñados para la amplificación tienen las siguientes secuencias:

Sac I

Primer directo: CCG GAG CTC GAT GTT CAA GCC GAA TTA TCA C

Hind III

Primer reverso: GCG CTG CGA AGC TTC CAT ATG TTC TCG AGT TCA A

Las PCRs se llevaron a cabo en un volumen de 25 μ L con una concentración de oligonucleótidos de 0.75 pmol/ μ L, empleando la enzima Expand High Fidelity PCR System (Roche, Mannheim, Alemania), aplicando las concentraciones de enzima y reactivos indicados por el proveedor, en un equipo RoboCycler Gradient 96 (Stratagene,

CA, USA). El programa empleado para la amplificación se presenta en la tabla VI. Los productos de la PCR fueron purificados mediante el kit High Pure PCR Product Purification (Roche).

Tabla VI. Programa empleado para la amplificación del gen *bfrA* mediante la PCR.

Etapa	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1. Desnaturalización inicial	-	94	2
2. Desnaturalización		94	1
3. Alineamiento	30	54	1
4. Elongación		72	2
5. Elongación final	-	72	10

Para la clonación se utilizó el vector de expresión pET-22b(+) (Novagen, CA, USA). El gen se insertó entre los sitios de restricción *Hind* III y *Sac* I usando el kit de ligación Quick ligation™ Kit (New England BioLabs) según indicaciones del proveedor. Para la producción de plásmido se electroporaron células de la cepa DH5 α , y su extracción y purificación se realizó mediante el kit High Pure Plasmid Isolation (Roche). Las clonas positivas fueron analizadas mediante PCR en colonia y patrones de restricción.

El análisis de electroforesis de los productos de la PCR se llevó a cabo en geles de agarosa al 0.8 % a voltaje constante de 100 V en una cámara EC320 Primo Minicell Submarine Gel System (Thermo Scientific, MA, USA), utilizando como marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, CA, USA). Los geles de agarosa se tiñeron con bromuro de etidio diluido 1:1000. Para verificar la construcción se realizó la secuenciación del DNA utilizando el secuenciador automático Applied Biosystems 3100 (CA, USA) de la Unidad de Secuenciación Automática de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, Morelos).

Para la producción de la BfrA se electroporaron células de la cepa BL21 empleando el vector pET-22b(+) con el gen *bfrA*. Las células transformadas se

propagaron en 5 mL de medio LB ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron a 37°C y 250 rpm durante 12 horas. Posteriormente se realizaron glicerolos de las células a una concentración del 30% (v/v) y se guardaron a -20°C para su preservación.

La BfrA fue producida realizando un precultivo inoculando un glicerol de la cepa BL21 transformada con el gen *bfrA* en 50 mL de medio LB ampicilina (100 µg/mL) por 12 horas a 37°C y 250 rpm. Posteriormente, el precultivo se inoculó en 950 mL de medio LB ampicilina (100 µg/mL) a 37°C y 200 rpm, permitiendo que las células crecieran hasta una densidad óptica de 0.5 leyendo en un espectrofotómetro Beckman DU 650 spectrophotometer (Beckman Coulter, CA, USA) a una longitud de onda de 600 nm. En seguida, las células se indujeron con IPTG (0.2 mM) a 20°C hasta que las células alcanzaron una densidad óptica de entre 1.5 y 2. La recuperación de las células se realizó por centrifugación durante 10 minutos a 4 °C y 10,000 rpm, y el pellet se lavó tres veces con una solución amortiguadora de acetatos 50 mM pH 5.5. Finalmente, las células se resuspendieron en 4 mL de solución amortiguadora de acetatos y se prensaron a 900 psi con una prensa French para lograr la extracción de la enzima. Los restos celulares fueron separados por centrifugación durante 30 minutos a 4°C y 12,000 rpm, y el extracto enzimático recibió un tratamiento térmico a 70°C por una hora para precipitar las proteínas termolábiles de *E. coli*, aprovechando el hecho de que la BfrA es estable por ser termofílica. Todos los ensayos enzimáticos de la BfrA se realizaron con el extracto previo tratamiento térmico.

7.3. Zimogramas y tinción con reactivo de Schiff

Para observar la actividad en gel de Fructozyme L, se realizaron geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10% de acuerdo al método de Laemmli [128], adicionando inulina de achicoria o levana de *L. mesenteroides* NRRL B-512F a una concentración final del 20 mg/mL. Debido a que se desconocen las estructuras de las inulinasas presentes en Fructozyme L, y para evitar una desnaturalización irreversible de las enzimas, no se utilizó mercaptoetanol. Los geles se corrieron utilizando una cámara Mighty Small II (Amersham Biosciences, NJ, USA) a

corriente constante de 20 mA con geles de 2 mm de espesor, empleando una solución amortiguadora con Tris-base 15.1 g/L, glicina 72 g/L y SDS 5 g/L. El marcador de PM utilizado fue PageRuler Unstained Protein Ladder (Fermentas). Después de correr los geles, se lavaron tres veces con una solución amortiguadora que contenía Tween 80 al 1% (v/v) con el propósito de renaturalizar las enzimas, acetatos 50 mM y pH 4.5. Finalmente, los geles se incubaron toda la noche a temperatura ambiente en solución amortiguadora de acetatos 50 mM y pH 4.5.

Para el caso del gel de actividad con la BfrA, se preparó un gel SDS-PAGE al 10% adicionando inulina de *L. citreum* CW28 a una concentración final del 10 mg/mL. Se cargó el gel con extracto de la enzima expresada en *E. coli* BL21, previo tratamiento térmico. Después de correr el gel y lavarlo tres veces con una solución amortiguadora que contenía Tween 80 al 1% (v/v), acetatos 50 mM y pH 5.5, se incubó toda la noche a 55°C.

Para observar la actividad enzimática, el carril de los geles que contenía el marcador de PM se cortó y se tiñó incubándose toda la noche en una solución de ácido acético 10% (v/v), metanol 30% (v/v) y azul de Coomassie 0.2% (v/v). Posteriormente, se efectuaron lavados para eliminar los excesos del colorante con una solución de ácido acético 10% (v/v) y metanol 30% (v/v). El resto de los carriles que contenían las proteínas con la actividad enzimática se tiñeron con reactivo de Schiff (Sigma), el cual se utiliza para detectar aldehídos mediante un cambio de la transparencia original al magenta o púrpura en presencia de aldehídos de acuerdo a la siguiente metodología: los carriles fueron sometidos a un tratamiento con etanol al 75% durante 30 minutos, posteriormente se incubaron 1 hora en ácido periódico 0.7% - ácido acético 5% y se lavaron tres veces con metabisulfito de sodio 0.2% - ácido acético 5% durante 20 minutos. Finalmente, los geles se pusieron en contacto con el reactivo de Schiff. La presencia de actividad se observó por la aparición de halos de claridad en el lugar donde la enzima realizó la hidrólisis.

7.4. Análisis enzimático

Los ensayos enzimáticos se realizaron empleando Fructozyme L (Novozymes, Dinamarca) y la BfrA bajo las condiciones mostradas en la tabla VII.

Enzima	Buffer	pH	Temperatura (°C)
Fructozyme L	Acetatos 50mM	4.5	60
BfrA	Acetatos 50mM	5.5	75

Durante la caracterización enzimática se midieron las velocidades iniciales de hidrólisis de las fructanas a diferentes concentraciones de sustrato, estando definido el límite superior de concentración por la solubilidad de cada fructana. Las fructanas empleadas se resumen en la tabla VIII. Las reacciones se monitorearon siguiendo la aparición de azúcares reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS) reportado por Miller [129]. Una unidad de actividad enzimática (U) está definida como la cantidad de enzima que libera una μmol de fructosa en un minuto de reacción.

Bajo las condiciones de reacción establecidas anteriormente y empleando sacarosa a una concentración de 439 mM (150 mg/mL), se encontró experimentalmente que Fructozyme L contiene una actividad de 25,323 U/mL, mientras que el extracto de la BfrA contiene una actividad de 165 U/mL.

Tabla VIII. Fructanas empleadas en el proceso de hidrólisis enzimática.

- (A) Inulina de achicoria
- (B) Agavina de *Agave tequilana* Weber var. *Azul*
- (C) Inulina de *Leuconostoc citreum* CW28
- (D) Levana de *Bacillus subtilis*
- (E) Levana de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F
- (F) Levana de *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293

7.5. Análisis de los productos finales de reacción de las distintas fructanas a 24 y 48 horas por HPLC

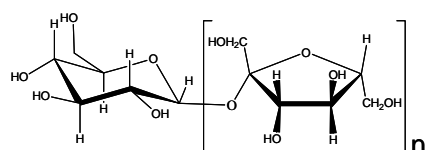
Se realizaron reacciones con una concentración de fructana de 50 mg/mL usando Fructozyme L o extracto enzimático de la BfrA ambas a 15 U/mL y se calculó el porcentaje de hidrólisis enzimática de fructanas a las 24 horas de reacción midiendo la cantidad de fructosa liberada. La fructosa liberada se midió mediante HPLC usando una columna Carbohydrate High Performance Column (4.6 x 250 mm cartridge) que permite la separación de monosacáridos y disacáridos usando como fase móvil Acetonitrilo:Agua a una relación de 75:25, a un flujo de 1.4 mL/min y a una temperatura de 35 °C.

Los productos obtenidos a las 24 horas y 48 horas se analizaron por HPLC para observar la distribución de PM y la formación de FOS. El análisis de la distribución de PM de las fructanas se llevó a cabo en un sistema de columnas de permeación en gel conectadas en serie: Ultrahydrogel Linear (7.8 x 300 mm) y Ultrahydrogel 500 (7.8 x 300 mm), con un índice de exclusión entre 0.50 y 10,000 kDa, empleando como eluyente nitrato de sodio 0.1 M a un flujo de 0.8 mL/min y a una temperatura de 35°C. Para analizar la formación de oligosacáridos durante las reacciones, se utilizó una columna de fase reversa C18 (Waters Spherisorb ODS2 Column, 4.6 x 250 mm), usando como fase móvil agua a un flujo de 0.7 mL/min a temperatura ambiente. El equipo de HPLC y las columnas utilizadas fueron de Water Corporation (MA, USA). En todos los ensayos se usó un detector Waters 410 Differential Refractometer.

7.6. Determinación del PM de las fructanas

La determinación del PM de las fructanas de origen bacteriano empleadas durante la experimentación se llevó a cabo mediante HPLC usando el sistema de columnas de permeación en gel Ultrahydrogel Linear y Ultrahydrogel 500 bajo las condiciones mencionadas anteriormente, para lo cual se construyó una curva patrón con estándares de dextranas con un intervalo de PM entre 5.2 y 668 kDa.

Para el caso de la agavina, debido a que el PM promedio calculado usando el sistema de columnas de permeación en gel daba un valor que salía del límite menor de exclusión del sistema, la determinación del PM y GP promedio se realizó mediante su hidrólisis y su posterior cuantificación como fructosa y glucosa por HPLC. Asumiendo que por cada molécula de fructana existe una molécula de glucosa [2], la determinación del GP promedio se obtuvo empleando la ecuación (2):

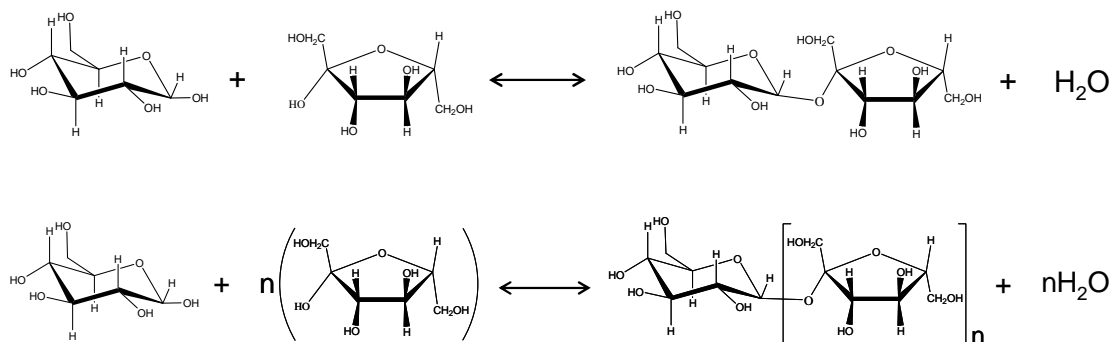


$$GP = n + 1 \quad (1)$$

$$GP_{\text{promedio}} = \frac{[\text{fructosa}_{\text{total}}] - [\text{fructosa}_{\text{libre}}]}{[\text{glucosa}_{\text{total}}] - [\text{glucosa}_{\text{libre}}]} + 1 \quad (2)$$

Antes de la hidrólisis se determinó primeramente la concentración de fructosa y glucosa libre presente en la muestra. Posteriormente se realizó una hidrólisis ácida durante una hora a 121°C usando H_2SO_4 a una concentración 0.05 N y se determinó la concentración de fructosa y glucosa total. La cuantificación de fructosa y glucosa se realizó por HPLC empleando la columna Carbohydrate High Performance Column bajo las condiciones señaladas anteriormente.

Durante la formación de un enlace glicosídico se pierde una molécula de agua:



Por lo tanto, al realizar un balance de masa de la ecuación química anterior se tiene que el PM promedio de la agavina se puede calcular mediante la ecuación:

$$PM = (GP)180 - (GP - 1)18 \quad (3)$$

Donde 180 es el PM de la fructosa y glucosa, y 18 es el PM del agua.

7.7. Cálculo de parámetros cinéticos

Para aquellas fructanas, incluyendo la sacarosa, que fueron hidrolizadas enzimáticamente de acuerdo con un comportamiento cinético de tipo Michaelis-Menten, se determinó la velocidad máxima de hidrólisis (V_{max}) y la constante de Michaelis (K_m) mediante un ajuste al modelo tipo Michaelis-Menten, en su variante linearizada de Lineweaver-Burk a datos obtenidos de velocidades iniciales en función de la concentración de sustrato. También se determinaron las constantes de pseudo primer y segundo orden que corresponden a la condición de baja concentración de sustrato (S) como se describe a continuación.

$$\text{Dada la cinética de Michaelis-Menten: } v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (4)$$

Cuando: $K_m \gg [S]$

$$K_m + [S] \approx K_m$$

$$\text{entonces: } v = \frac{V_{\max}}{K_m} [S] \quad (5)$$

donde: $k' = \frac{V_{\max}}{K_m}$ es la constante de pseudo primer orden.

Por lo que se puede plantear que:

$$v = k'[S] \quad (6)$$

Por otro lado, dado que la velocidad depende de la concentración de enzima:

$$v = k''[E][S] \quad (7)$$

$$\text{donde } k' = k''[E] \quad (8)$$

siendo k'' la constante de segundo orden.

En la mayor parte de los casos, particularmente de fructanas de origen bacteriano, el comportamiento cinético observado correspondió al de una cinética de primer orden con respecto al sustrato, cuando la concentración de enzima permanece constante. En estas reacciones se calcularon las constantes de velocidad de pseudo primer y segundo orden (k' y k'') como se describe a continuación, a partir de datos de concentración a lo largo del tiempo obtenidos directamente de la reacción. Para este fin se integró el modelo de primer orden considerando la concentración de enzima constante:

$$\text{modelo de primer orden: } v = \frac{dF}{dt} = -k' F \quad (9)$$

$$\text{modelo integrado de primer orden: } \ln \frac{F_o}{F} = k' t \quad (10)$$

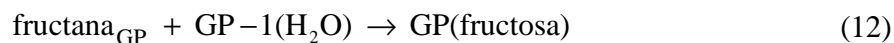
Donde F representa la concentración molar de fructosa en el polímero, t es el tiempo y k' es la constante de velocidad de primer orden. Debido a que la velocidad depende también de la concentración de la enzima se tiene que (al igual que en la ecuación 6 y 7): $k' = k''[E]$, donde k'' es la constante de velocidad de segundo orden.

F_o , se calculó mediante la ecuación:

$$F_o = \frac{F_o'}{180r} \quad (11)$$

donde F_o es la concentración inicial equivalente de fructosa de la fructana en solución (moles de fructosa / L), F_o' es la concentración inicial másica de fructosa de la fructana en solución (g de fructosa / L), 180 es el PM de la fructosa y r es un factor de corrección

al cambiar de concentración en masa de fructosa en la fructana a concentración molar que toma en cuenta el número de moléculas de agua involucradas. Es decir:



De tal forma que:

$$r = \frac{\text{fructana}_{\text{GP}}}{(\text{GP})\text{fructosa}} \quad (13)$$

$$r = \frac{\text{PM de la fructana}}{(\text{PM de la fructosa})(\text{GP})} \quad (14)$$

Cuando $\text{GP} \gg 10$, el factor $r \approx 0.9$.

F se calculó mediante la diferencia entre F_o y los moles de fructosa liberados durante la reacción a un determinado tiempo cuantificados mediante la aparición de azúcares reductores como se describió previamente.

RESULTADOS

Y

DISCUSIÓN

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Determinación del PM promedio de las fructanas bacterianas y agavina

El PM promedio calculado para las diferentes fructanas empleadas durante la experimentación se presenta en la tabla IX. Para calcular el GP a partir del PM se empleó la ecuación 14. En el caso de la agavina, debido a que durante la determinación del PM su valor salía por debajo del límite inferior de exclusión del sistema de columnas empleado, se decidió obtener su PM a partir de la determinación de su GP.

Tabla IX. PM y GP promedio de fructanas empleadas durante la experimentación.

Fructana	PM promedio (kDa)	GP estimado ^(†)
Inulina de achicoria	8.3 ^(‡)	51
Agavina de <i>A. tequilana</i> Weber var Azul	6.2	38 ^(†)
Inulina de <i>L. citreum</i> CW28	3,000	18,519
Levana de <i>B. subtilis</i>	8.3 y 3,500 ^(¶)	51 y 21,605
Levana de <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293	3,000	18,519
Levana de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B-512F	2,200	13,580

† El GP estimado se calculó utilizando la ecuación 14. Para el caso de la agavina, como se mencionó en materiales y métodos, primero se calculó el GP promedio y posteriormente se estimó el PM promedio.

‡ El PM promedio de la inulina de achicoria es el correspondiente al producto HP de Orafti.

¶ La levana de *B. subtilis* esta formada por dos distribuciones, una de bajo PM de 8.3 kDa y otra de alto PM de 3,500 kDa.

Los resultados presentados en la tabla IX muestran como las fructanas bacterianas poseen PM promedio tres órdenes de magnitud mayores a los PM promedio de las fructanas de origen vegetal. Sin embargo, la levana producida por *B. subtilis* esta constituida por una distribución bimodal formada por levana de bajo PM (8.3 kDa) y de alto PM (3,500 kDa), estando la de menor PM en el intervalo de valores de las fructanas vegetales.

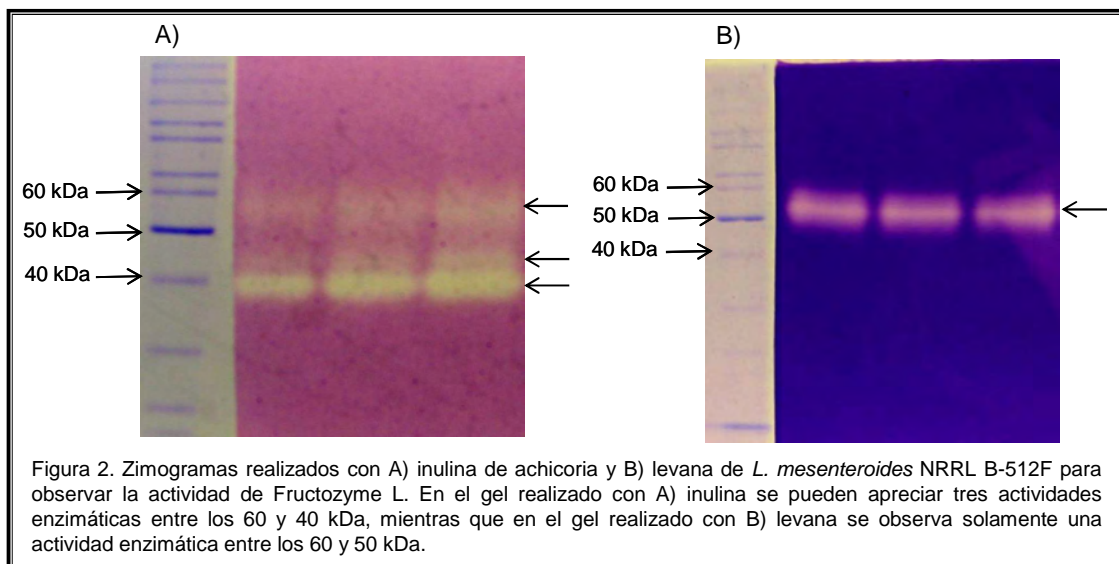
En lo que respecta a la inulina de achicoria, se sabe que las plantas de achicoria producen inulina con un intervalo de GP entre 3 y 60 [8]. En nuestro trabajo la inulina de

achicoria empleada fue la HP de Orafti, la cuál, mediante un proceso de refinamiento es estandarizada a un GP entre 23 y 60, con un PM promedio de 8.3 kDa.

8.2. Análisis del proceso de hidrólisis de fructanas mediante Fructozyme L

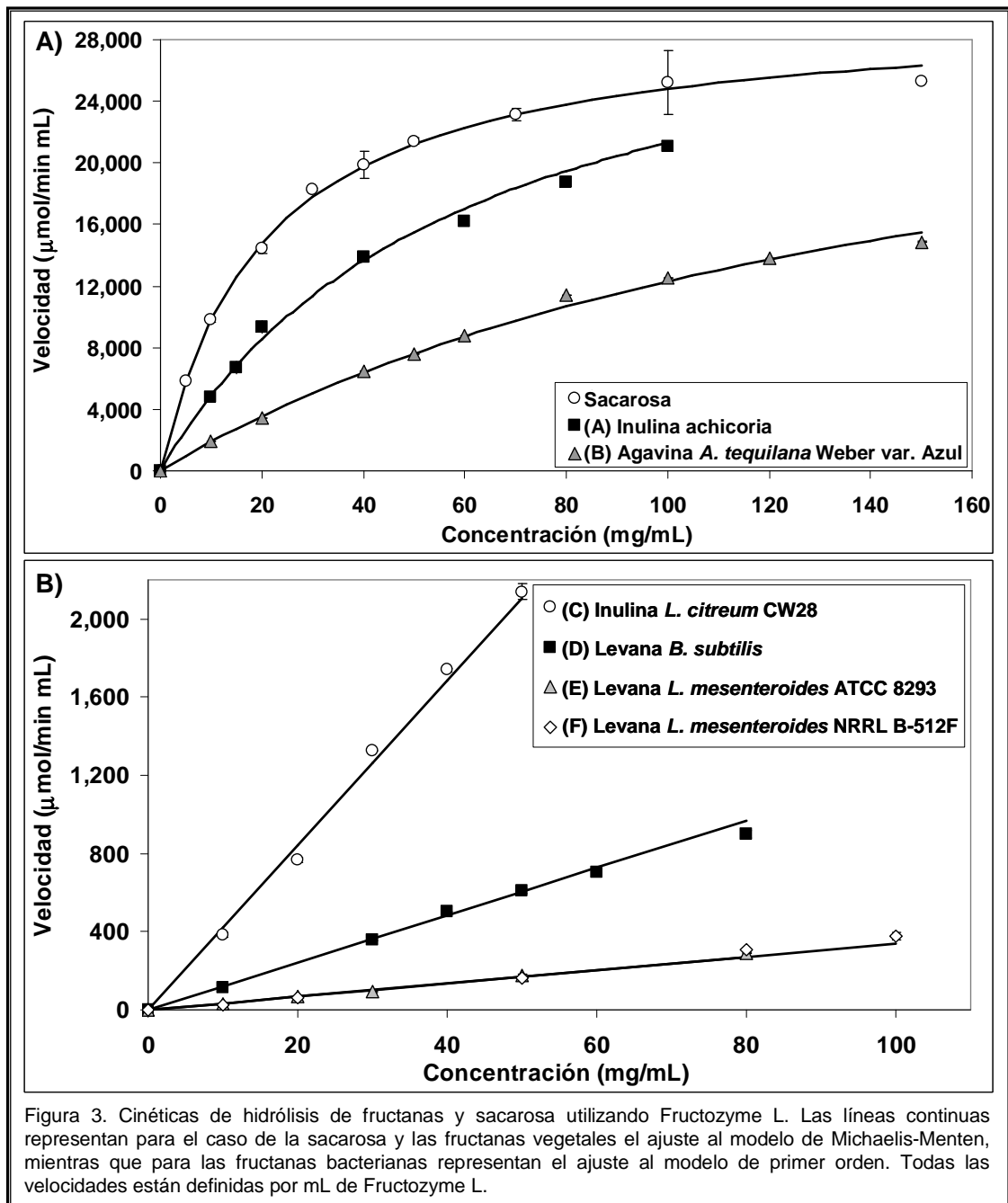
8.2.1. Zimogramas

El zimograma realizado con Fructozyme L en un gel con inulina (figura 2A) permite apreciar tres halos de claridad, uno a la altura de 40 kDa, otro entre los 40 y 50 kDa y un tercero entre los 50 y 60 kDa, mientras que el zimograma realizado con levana (figura 2B) presenta sólo un halo de actividad enzimática entre los 50 y 60 kDa. Estos geles revelan que, efectivamente, el producto Fructozyme L es una mezcla de al menos tres inulinasas, siendo la actividad presente en el gel de levana presumiblemente perteneciente a una exoinulinasas, ya que como se mencionó en generalidades, las exoinulinasas son β -fructofuranosidasas inespecíficas que hidrolizan tanto inulinas como levanas.



8.2.2. Hidrólisis de fructanas mediante Fructozyme L

Se llevaron a cabo cinéticas enzimáticas con el fin de estudiar el comportamiento de la preparación comercial Fructozyme L en la hidrólisis de fructanas de diferentes orígenes. Las gráficas que describen la velocidad inicial de hidrólisis observada a diferentes concentraciones de sustrato se muestran en la figura 3.

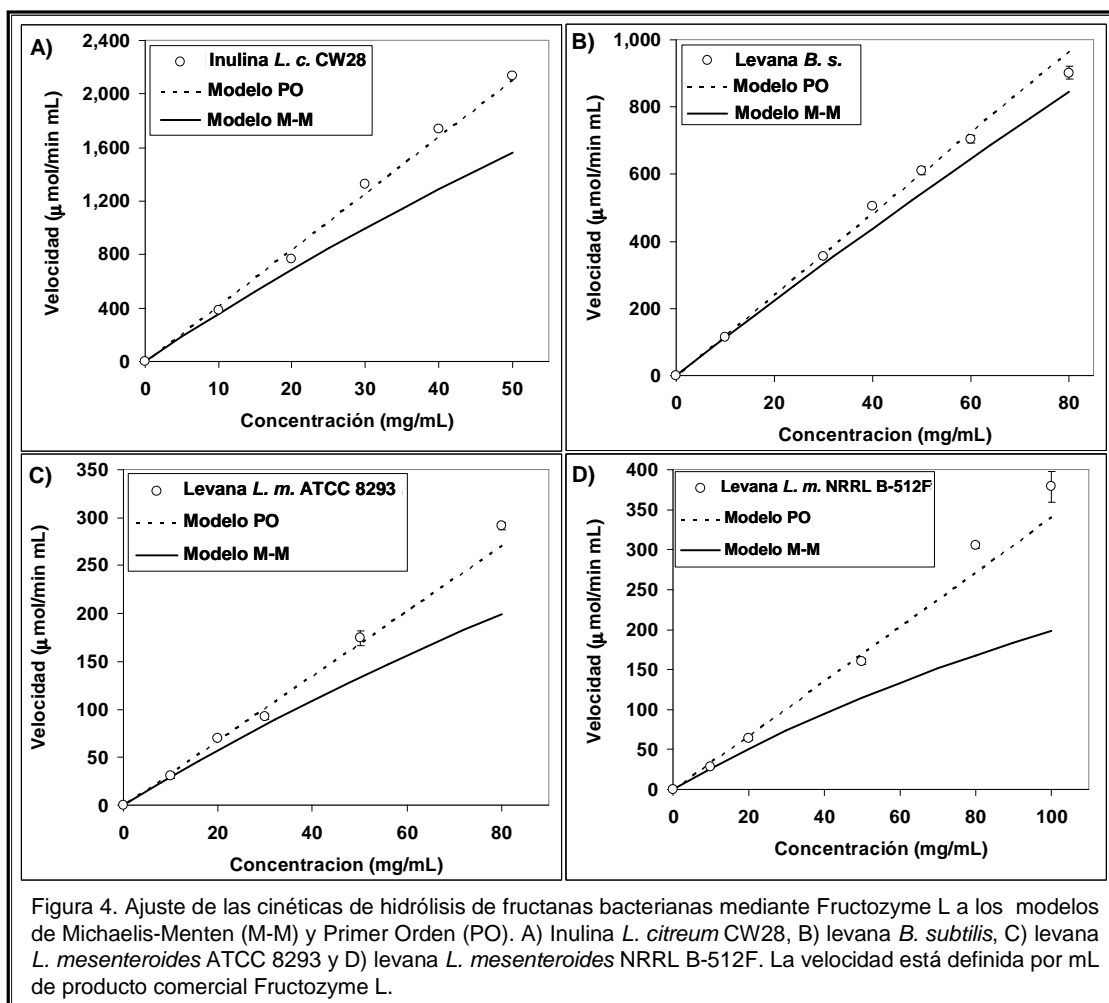


Únicamente se pudieron describir mediante el modelo de Michaelis-Menten los comportamientos de hidrólisis enzimática de las fructanas de origen vegetal, ya que, como se puede observar en la figura 3A, aunque no se alcanzaron concentraciones de saturación enzimática, los datos experimentales tuvieron un buen ajuste con el modelo lográndose determinar los parámetros cinéticos. Es importante señalar que la sacarosa fue el único sustrato con el que se observó un claro comportamiento michaeliano al alcanzar un nivel de saturación con el sustrato, y con respecto a las fructanas vegetales, aunque se pudieron determinar parámetros cinéticos, éstos son hipotéticos, ya que estamos suponiendo que Fructozyme L se satura con el sustrato, sin embargo, la baja solubilidad de las fructanas vegetales a las condiciones empleadas durante la experimentación impidió que se ampliara el intervalo de concentraciones hasta observar una etapa de orden cero en las cinéticas. Los valores de V_{max} y K_m estimados para la sacarosa, la inulina de achicoria y la agavina se muestran en la tabla X. Para el resto de las fructanas, y en los mismos intervalos de concentración se observaron cinéticas de primer orden (figura 3B), y como se muestra en la figura 4, los datos experimentales no se ajustaron al modelo de Michaelis-Menten. Cabe mencionar que, como ocurrió con las fructanas vegetales, la concentración de fructana bacteriana en estos casos se llevó hasta el límite de solubilidad sin que se observaran cambios en el comportamiento cinético de primer orden.

Tabla X. Parámetros cinéticos de sacarosa y fructanas vegetales hidrolizadas por Fructozyme L estimados mediante la representación gráfica de Lineweaver-Burk del modelo de Michaelis-Menten.

Sustrato	V_{max} (U/mL) ^(†)	K_m (mM)
Sacarosa	29,876 ± 227	59.9 ± 0.6
Inulina de achicoria	34,117 ± 2,246	7.2 ± 0.8 ^(‡)
Agavina de <i>A. tequilana</i> Weber var. <i>Azul</i>	32,254 ± 3,301	27 ± 3.8 ^(‡)

† Velocidad definida por mL del producto comercial Fructozyme L.
‡ Asumiendo un PM promedio para la inulina de achicoria y agavina de 8.3 y 6.2 kDa respectivamente.



La preferencia de Fructozyme L por hidrolizar estructuras de fructanas de bajo PM y con enlaces β 2-1 queda de manifiesto al comparar la escala de valores de velocidad de los datos reportados en la figura 3, en la que se puede observar como se alcanzaron mayores velocidades con las fructanas de origen vegetal que con las bacterianas en los mismos límites de concentración. Es sabido que las moléculas de fructana de plantas son más pequeñas que las bacterianas y poseen en promedio entre 30 y 50 residuos de fructosa, excediendo ocasionalmente los 200, mientras que las fructanas de origen bacteriano pueden estar constituidas por más de 100,000 unidades de fructosa [2]. En lo referente al tipo de enlace, se puede observar como dentro de las fructanas vegetales, con Fructozyme L se alcanzan mayores velocidades de hidrólisis con la inulina de achicoria que con la agavina, ya que la inulina de achicoria es una inulina lineal sin ramificaciones

mientras que la agavina tiene estructura de fructana mezclada (figura 1). En el caso de las fructanas bacterianas se observan mayores velocidades con la inulina de *L. citreum* CW28 que con el resto de las levanas.

Al comparar los parámetros cinéticos obtenidos con la sacarosa y las fructanas vegetales (tabla X) se observa como Fructozyme L alcanza actividades semejantes con los diferentes sustratos, sin embargo, al comparar las K_m queda claro que el complejo enzimático presentó una afinidad muy alta por la inulina de achicoria, ya que esta es 8 y 4 veces menor que la de sacarosa y agavina respectivamente. En lo que referente a las fructanas de origen vegetal, se observa una mayor afinidad por la inulina de achicoria que por la agavina de *A. tequilana* Wever var. *Azul*. Esto es debido probablemente, a que la agavina posee una estructura compleja tipo fructana mezclada con una combinación de enlaces β 2-1 y β 2-6, mientras que la inulina de achicoria es una fructana lineal.

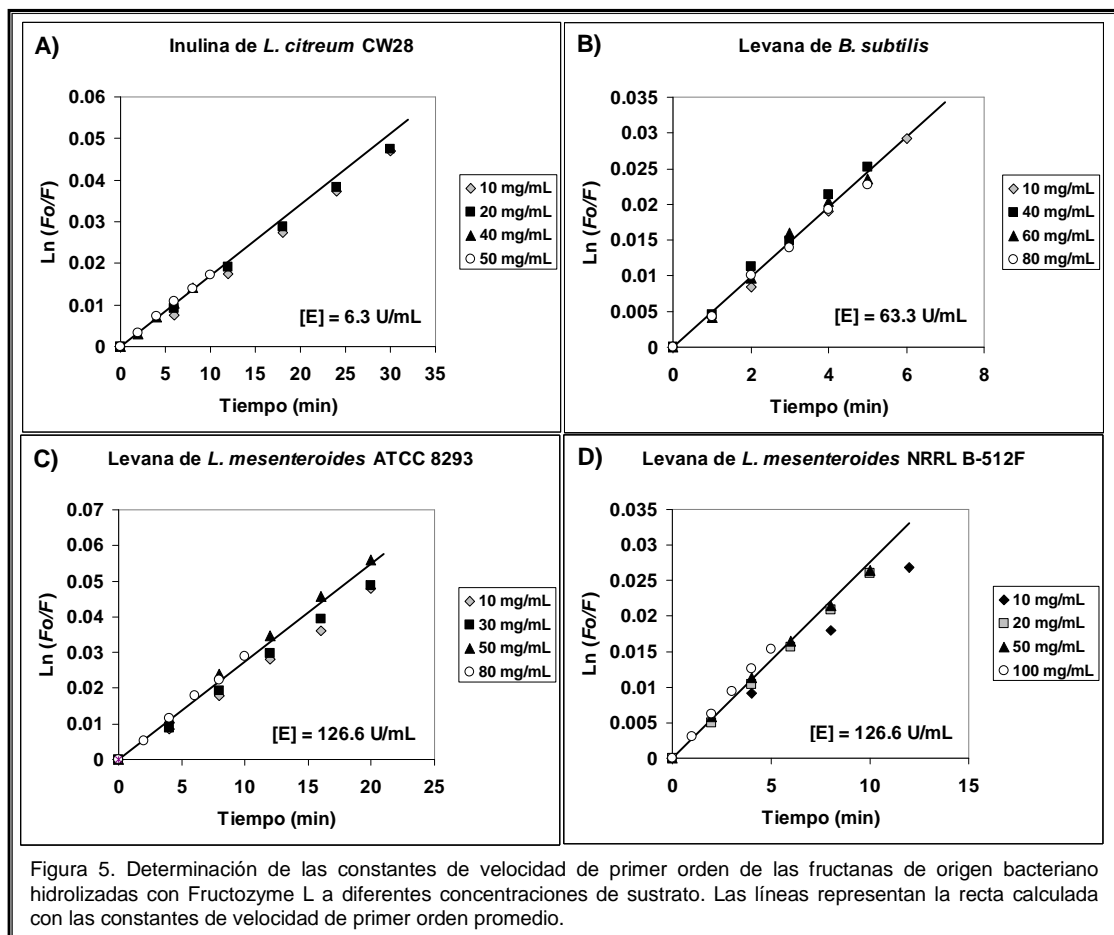


Figura 5. Determinación de las constantes de velocidad de primer orden de las fructanas de origen bacteriano hidrolizadas con Fructozyme L a diferentes concentraciones de sustrato. Las líneas representan la recta calculada con las constantes de velocidad de primer orden promedio.

En lo que respecta a la hidrólisis de fructanas de origen bacteriano, como ya se mencionó, el proceso no obedece una cinética tipo Michaelis-Menten sino de primer orden. En la figura 5 se muestran las gráficas de las que se calculan las constantes de velocidad de primer orden para cada fructana bacteriana. Los puntos de concentración experimentales en la figura son relativos a la concentración inicial de sustrato, por lo que se puede observar claramente el comportamiento de primer orden a 60°C a diferentes concentraciones de sustrato y a lo largo del tiempo. En la tabla XI se presentan los valores de las constantes de velocidad obtenidas para cada una de las fructanas, observándose una importante variación de acuerdo con la estructura y PM del polímero. Al comparar los datos de constantes de segundo orden de reacción presentados en la tabla XI (la constante de primer orden es función de la concentración de enzima), y como complemento de lo reportado en la tabla X, se observa que las fructanas vegetales (A y B) fueron hidrolizadas con una mayor rapidez que las bacterianas (C a F), siendo la inulina de achicoria el mejor sustrato para la hidrólisis con una constante de segundo orden 3 veces mayor que el obtenido para la agavina. Entre las fructanas de origen bacteriano, la inulina de *L. citreum* CW28 (C) fue hidrolizada con mayor rapidez que las levanas, teniendo una constante de segundo orden de 6.5% con respecto a la de achicoria. Para el caso de las levanas, la presencia de polímero de bajo PM en la levana de *B. subtilis* (C) puede explicar la mayor rapidez de hidrólisis con respecto a las levanas de las dos cepas de *L. mesenteroides* (E y F).

La estructura propuesta por Tanaka y col. [52] para la levana de *B. subtilis* consiste de un polisacárido con cadenas lineales de levana unidas entre ellas mediante enlaces β 2-1 (figura 1); las estructuras propuestas para otras fructanas de origen bacteriano [46,49,130] siguen los mismos patrones estructurales sólo que en el caso de las inulinas los enlaces β 2-6 constituyen las uniones de las cadenas. El tamaño y el número de ramas en cada fructana bacteriana, así como la posición de los enlaces de ramificación dependen de la enzima que la produce. A excepción de *B. subtilis* que produce una mezcla de levanas con un PM promedio de 8.3 kDa y 3,500 kDa, las fructanas bacterianas utilizadas en este estudio poseen PM promedio mayores a 2,000 kDa. Al analizar las constantes de velocidad de segundo orden de las fructanas

bacterianas se observa como la inulina de *L. citreum* CW28 (C) se hidroliza más rápidamente, a pesar de que la levana de *B. subtilis* (D) posee un PM tres órdenes de magnitud menor. Estas diferencias son debidas a la mayor afinidad que posee Fructozyme L por los enlaces β 2-1 con respecto a los enlaces β 2-6; además, mientras que la inulina de *L. citreum* CW28 es hidrolizada por la mezcla de endo y exoinulinasas, las levanas en principio sólo son susceptibles al ataque de las exoinulinasas. El hecho de que la velocidad de hidrólisis obtenida con las levanas de las dos cepas de *L. mesenteroides* sea similar posiblemente se debe a que tienen el mismo GP en las ramificaciones. Por lo tanto, de los resultados antes expuestos se puede inferir que Fructozyme L tiene una escala de preferencia hidrolítica mayor hacia estructuras de bajo PM y con enlaces β 2-1, que disminuye con el incremento en el GP y que se hace más difícil con la presencia de enlaces β 2-6.

Tabla XI. Comparación de constantes de velocidad de reacción usando Fructozyme L para hidrolizar diversas fructanas.

Fructana	Tipo de cinética	[E] (U/mL)	$k' \times 1000$ (min^{-1})	k'' fructana / k'' inulina de achicoria ^(‡) (%)
(A) Inulina Achicoria	Michaelis-Menten	6.3	25.6	100
(B) Agavina <i>A. t.</i> Weber var. <i>Azul</i>	Michaelis-Menten	6.3	9.01	35.2
(C) Inulina <i>L. c.</i> CW28	Primer orden	6.3	1.68	6.5
(D) Levana <i>B. s.</i>	Primer orden	63.3	4.88	1.9
(E) Levana <i>L. m.</i> ATCC 8293	Primer orden	126.6	2.64	0.5
(F) Levana <i>L. m.</i> NRRL B-512F	Primer orden	126.6	2.66	0.5

† La levana de *B. subtilis* esta formada por dos distribuciones, una de bajo PM de 8.3 kDa y otra de alto PM de 3,500 kDa.

‡ Dado que Fructozyme L se trata de un producto comercial, la concentración molar de enzima es desconocida, por lo que no se pueden obtener k'' . Por lo tanto se realizó una comparación relativa de las k'' de las diferentes fructanas respecto a la de inulina de achicoria, calculadas usando la concentración en U/mL de enzima utilizada.

8.2.3. Conversión alcanzada en las reacciones de hidrólisis de distintas fructanas con Fructozyme L

En la figura 6 se compara el nivel de hidrólisis a las 24 horas de acción de Fructozyme L sobre las diferentes fructanas, observándose que las fructanas vegetales (A y B) y la inulina de *L. citreum* CW28 (C) fueron hidrolizadas a un nivel mayor que las levanas, siendo la inulina de achicoria la fructana con la que se alcanzó la mayor conversión llegando hasta un 86% de hidrólisis, mientras que con la agavina y la inulina de *L. citreum* CW28 se alcanzaron niveles de conversión alrededor del 80%. Aunque estructuralmente las inulinas de achicoria y *L. citreum* CW28 son diferentes, poseen una relación de enlaces β 2-1/ β 2-6 muy alta que puede explicar los niveles semejantes de hidrólisis alcanzados. La estructura de la agavina de *A. tequilana* Weber var. azul es más compleja que la que poseen las inulinas de achicoria y *L. citreum* CW28 y está reportado que la relación de enlaces β 2-1/ β 2-6 en las agavinas varían entre 1.6 y 2.69 dependiendo de la región de producción [4], por lo que la explicación a los niveles de hidrólisis semejantes alcanzados junto con las inulinas se debe a que la agavina posee un PM promedio muy pequeño (6.2 kDa) comparado con la inulina de *L. citreum* CW28 (3,000 kDa).

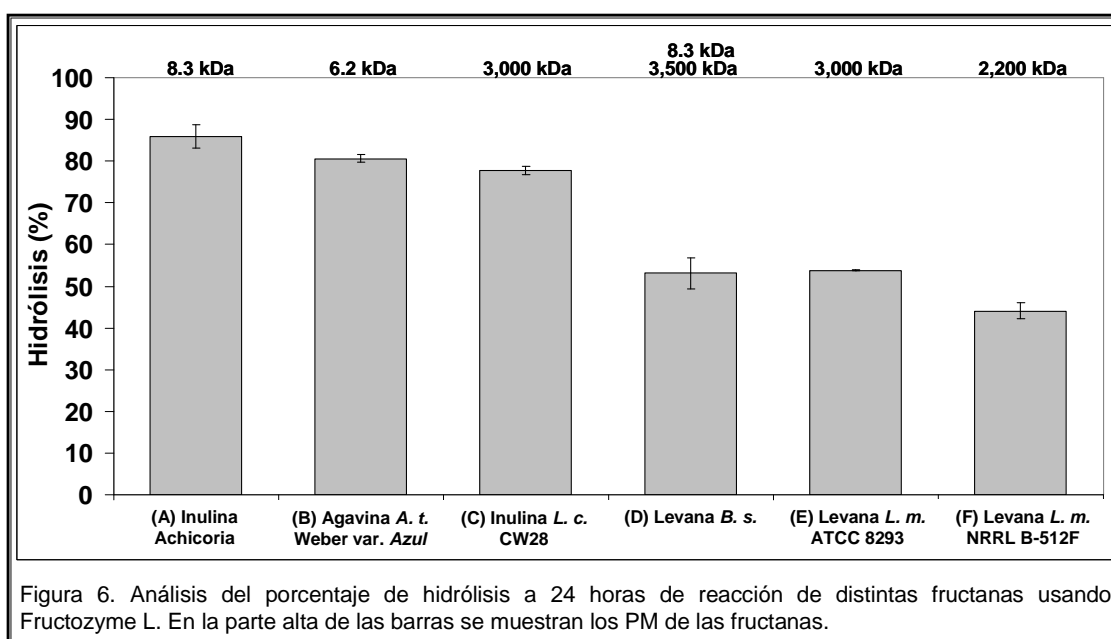


Figura 6. Análisis del porcentaje de hidrólisis a 24 horas de reacción de distintas fructanas usando Fructozyme L. En la parte alta de las barras se muestran los PM de las fructanas.

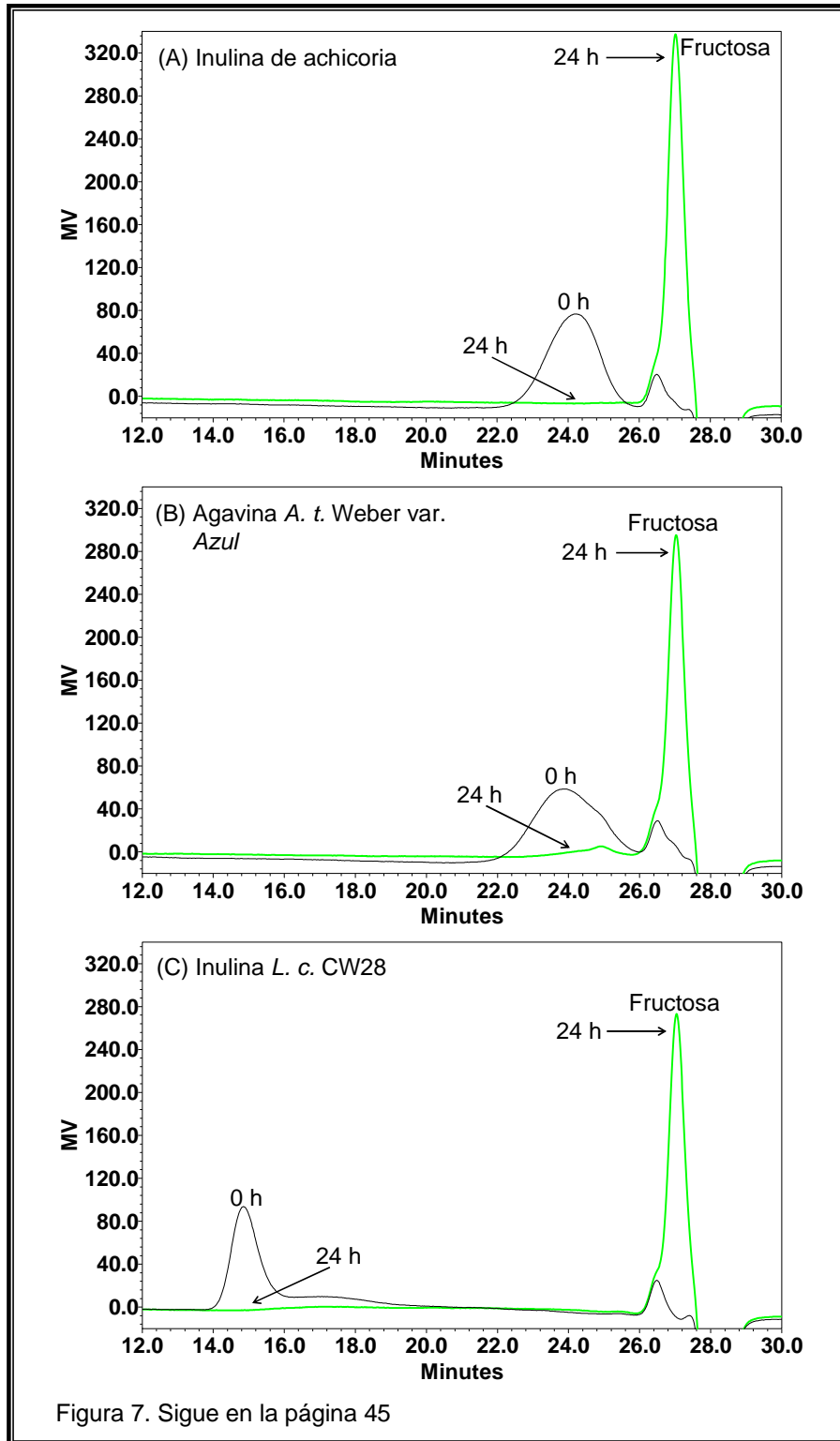
En el caso de las levanas, los porcentajes de hidrólisis inferiores obtenidos son congruentes con sus estructuras, ya que poseen una muy baja relación de enlaces β 2-1/ β 2-6. Aunque al realizar una comparación entre ellas, se observa que las levanas de *B. subtilis* (D) y de *L. mesenteroides* ATCC 8293 (E), dado que posiblemente tengan estructuras semejantes, son hidrolizadas en las mismas proporciones (aproximadamente 54%), mientras que la levana de *L. mesenteroides* NRRL B-512F tan solo fue hidrolizada en un 44%.

Anteriormente se comentó que el GP de las ramas de las levanas producidas por las dos cepas de *L. mesenteroides* era la posible causa de que se hidrolizaran a velocidades iniciales semejantes, por lo que una explicación al hecho de que se alcancen distintos niveles de hidrólisis es que las ramificaciones en estas levanas tengan un arreglo distinto, siendo más complejo el de la levana de la cepa NRRL B-512F. De estos resultados se puede observar claramente cómo dos fructanas procedentes de microorganismos de la misma especie pero de diferentes cepas, dan lugar a fructanas con características de hidrólisis diferentes, de lo que se infieren estructuras diferentes.

8.2.4. Productos de la degradación de fructanas con Fructozyme L

Los productos finales de hidrólisis de las fructanas en reacciones realizadas durante 24 y 48 horas se analizaron en columna de permeación en gel con el fin de analizar la distribución de PM. Los resultados se muestran en la figura 7. En el caso de las fructanas vegetales y la inulina de *L. citreum* CW28 se puede observar que a las 24 horas de reacción el polímero es hidrolizado prácticamente en su totalidad. Sin embargo, en el caso de las levanas, la hidrólisis es más lenta y a las 24 horas se puede aun observar una distribución de PM de las fructanas, requiriéndose de hasta 48 horas para no detectar polímero por HPLC; en el caso de la levana de *L. mesenteroides* NRRL B-512F el tiempo requerido es aún mayor. Al analizar el proceso de hidrólisis de la levana de *B. subtilis* se observa como a las 24 horas de reacción la levana de bajo PM se ha hidrolizado en su totalidad, mientras que se mantiene una proporción de la levana de alto PM, resultado que concuerda con la conclusión de que Fructozyme L posee una mayor afinidad por

polímeros de bajo PM, y a su vez, permite demostrar que la mayor constante de velocidad de segundo orden obtenida para la levana de *B. subtilis*, respecto a las otras levanas, se debe a la presencia de polímero de bajo PM que es rápidamente hidrolizado.



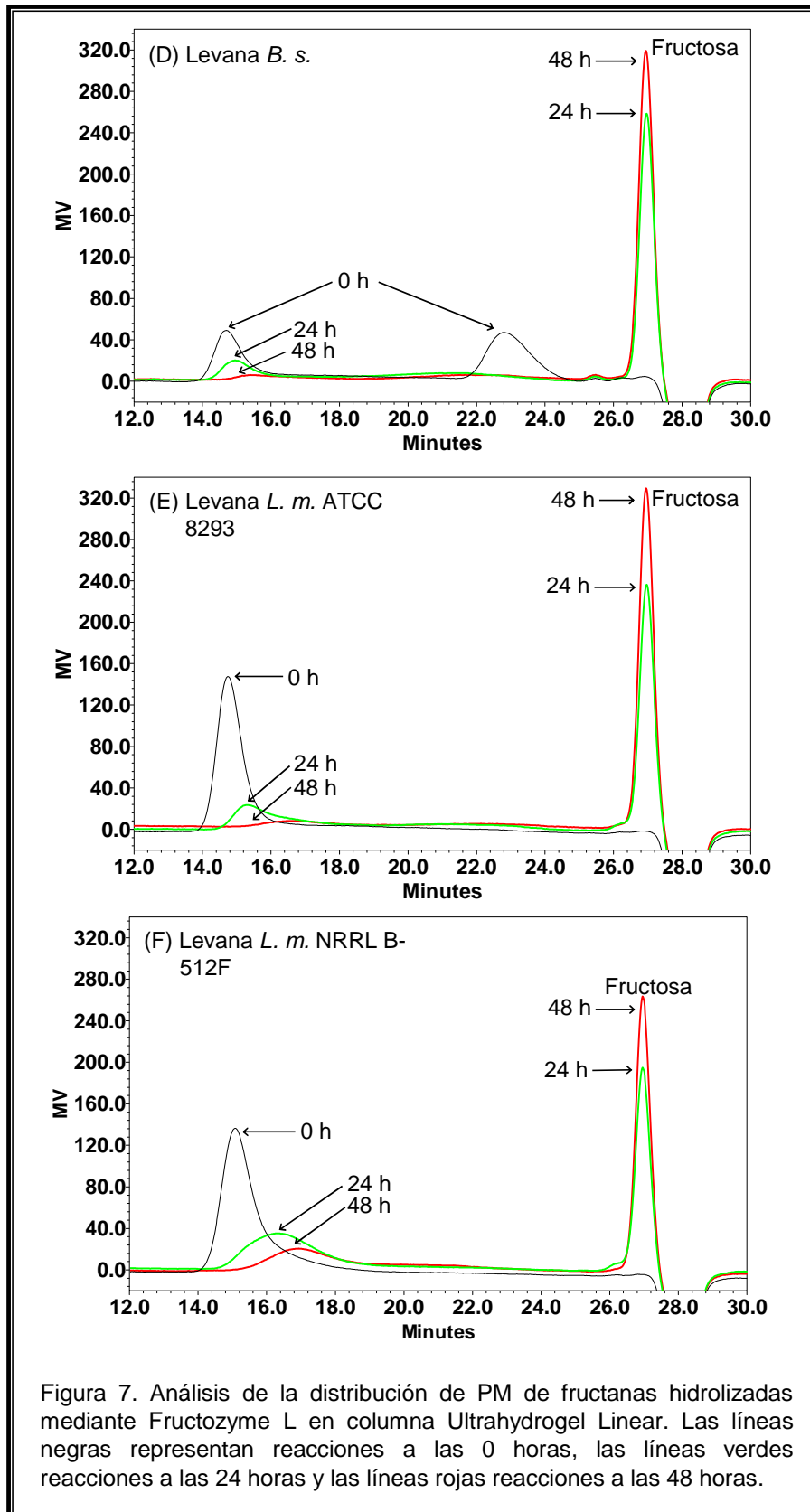


Figura 7. Análisis de la distribución de PM de fructanas hidrolizadas mediante Fructozyme L en columna Ultrahydrogel Linear. Las líneas negras representan reacciones a las 0 horas, las líneas verdes reacciones a las 24 horas y las líneas rojas reacciones a las 48 horas.

Del análisis de la formación de productos durante las hidrólisis de las fructanas en columna C18 (figuras 8), se desprende que en ningún momento durante la reacción se acumularon FOS que pudieran ser detectados por el método utilizado.

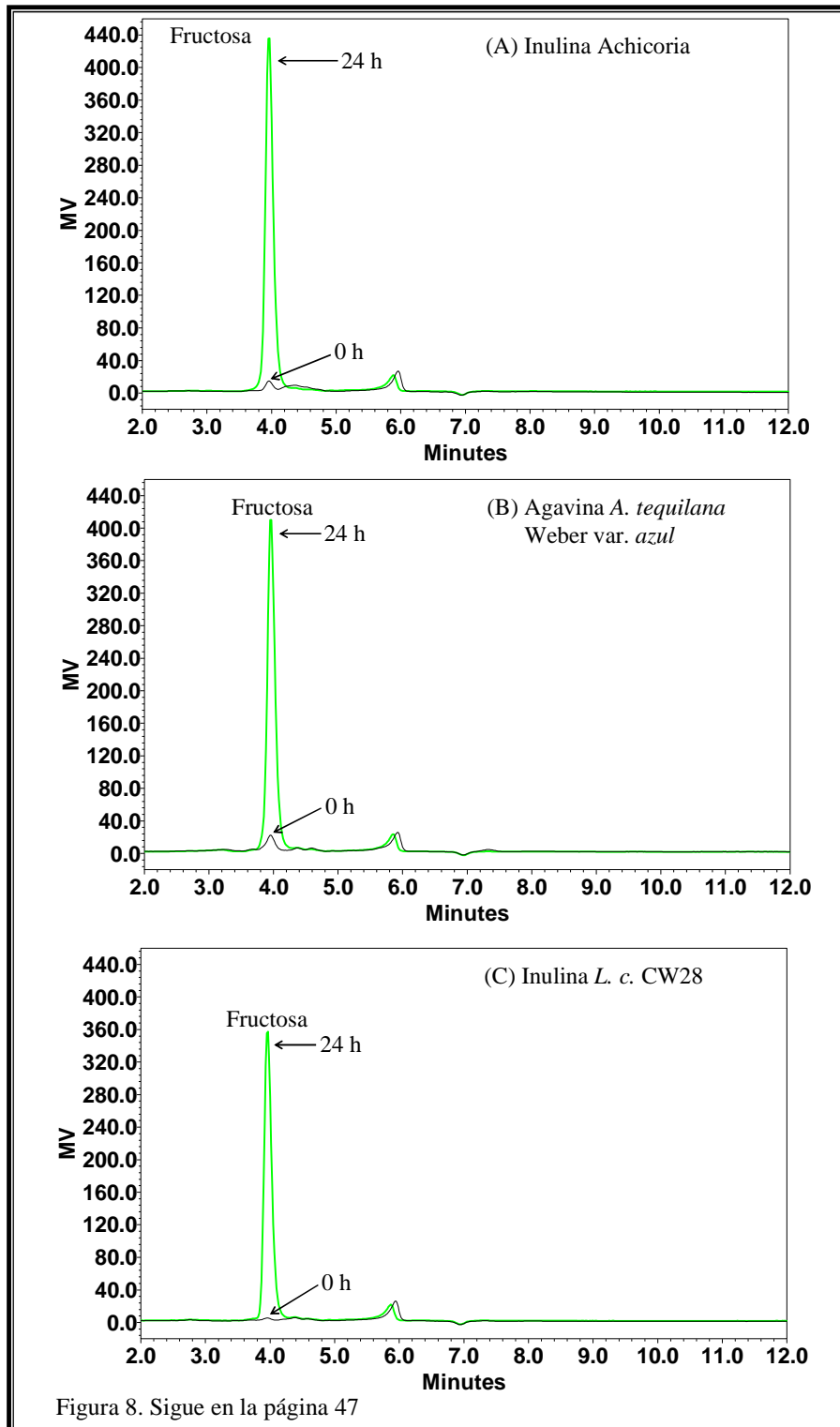
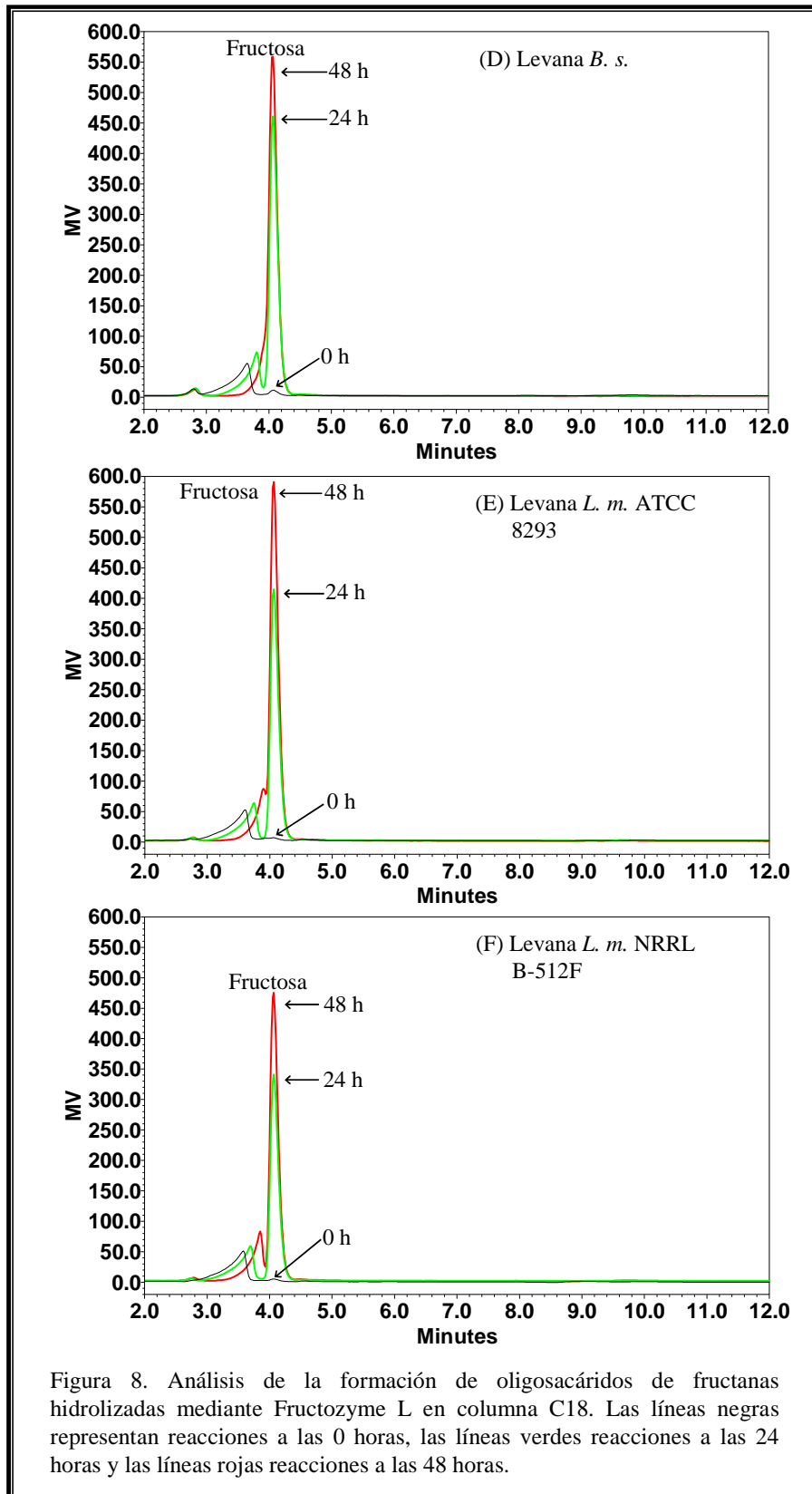


Figura 8. Sigue en la página 47



Con el fin de determinar si se acumulaban FOS durante la reacción, se realizaron cinéticas de hidrólisis de la inulina de *L. citreum* CW28 y la levana de *L. mesenteroides* NRRL B-512F por 12 horas muestreando cada 3 horas. Este análisis tampoco mostró acumulación de FOS (figura 9).

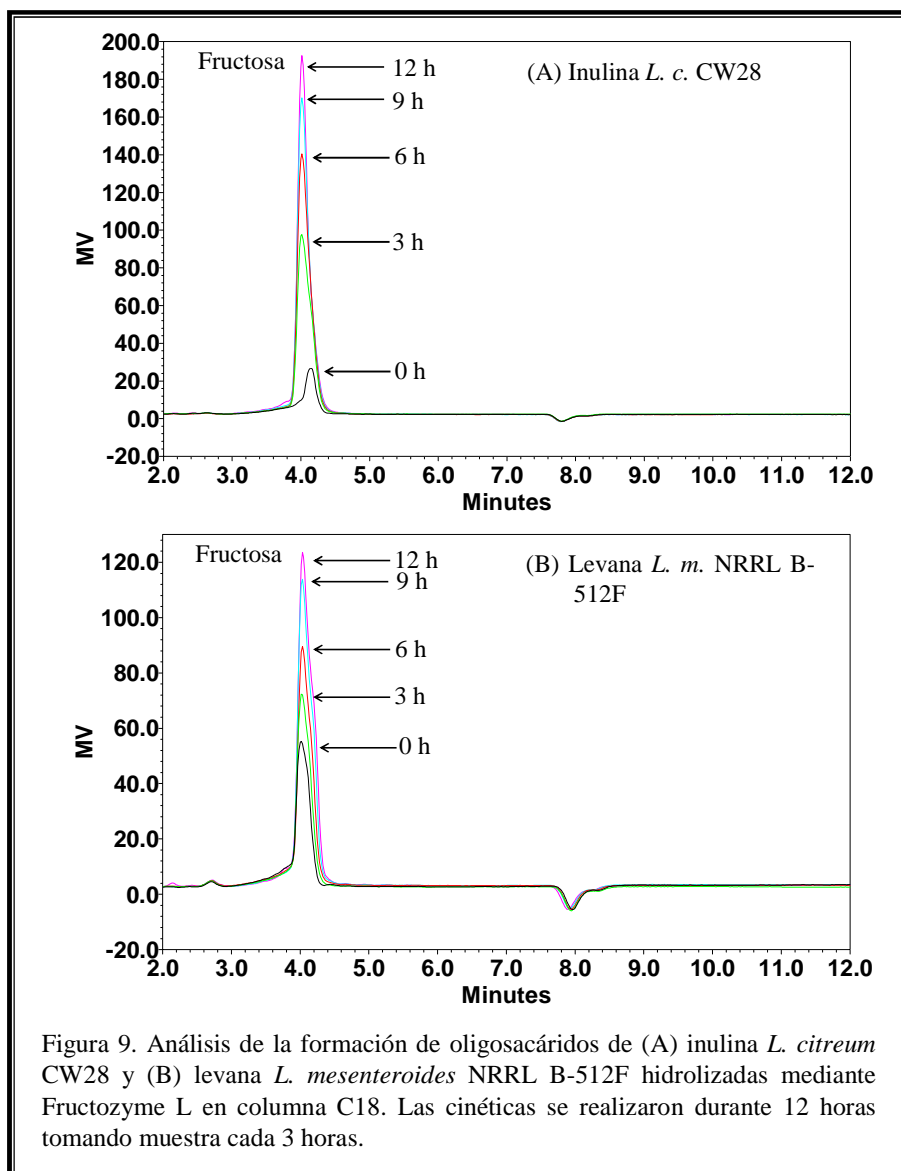


Figura 9. Análisis de la formación de oligosacáridos de (A) inulina *L. citreum* CW28 y (B) levana *L. mesenteroides* NRRL B-512F hidrolizadas mediante Fructozyme L en columna C18. Las cinéticas se realizaron durante 12 horas tomando muestra cada 3 horas.

8.3. Análisis de hidrólisis de fructanas mediante la BfrA

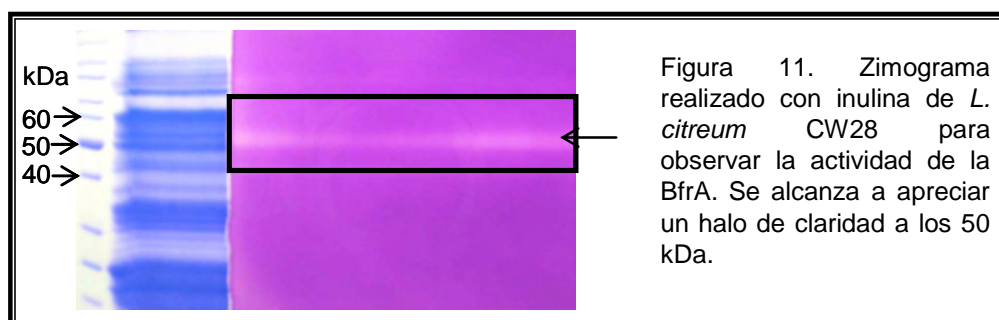
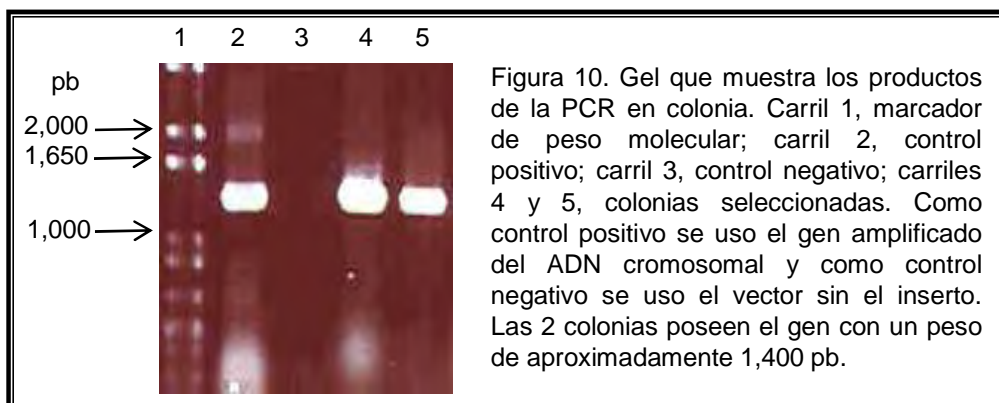
Con el fin de extender este análisis a otro sistema enzimático se produjo BfrA, fructanohidrolasa que libera residuos de fructosa a partir del extremo no reductor de inulina y levana, y se determinaron los patrones cinéticos correspondientes. Para el análisis realizado con la BfrA se seleccionó a la inulina de achicoria, inulina de *L. citreum* CW28 y levana de *L. mesenteroides* NRRL B-512F como fructanas representativas del primer estudio.

8.3.1. Amplificación y Clonación del gen *bfrA* de la bacteria *T. maritima* en *E. coli*

Después de haber amplificado el gen *bfrA* de la bacteria *T. maritima* se llevó a cabo la ligación del gen al vector pET-22b(+) entre los sitios de restricción *Hind* III y *Sac* I. Se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α . Posteriormente se seleccionaron 2 colonias transformadas y se realizó una PCR en colonia para verificar la presencia del gen de interés. La PCR se realizó usando los mismos oligos diseñados para amplificar el gen *bfrA* del ADN cromosomal de *T. maritima*. En la figura 10 se presenta un gel donde se muestran los productos de amplificación de la PCR en colonia, observándose que las 2 colonias poseen el gen con un tamaño de aproximadamente 1,400 pb.

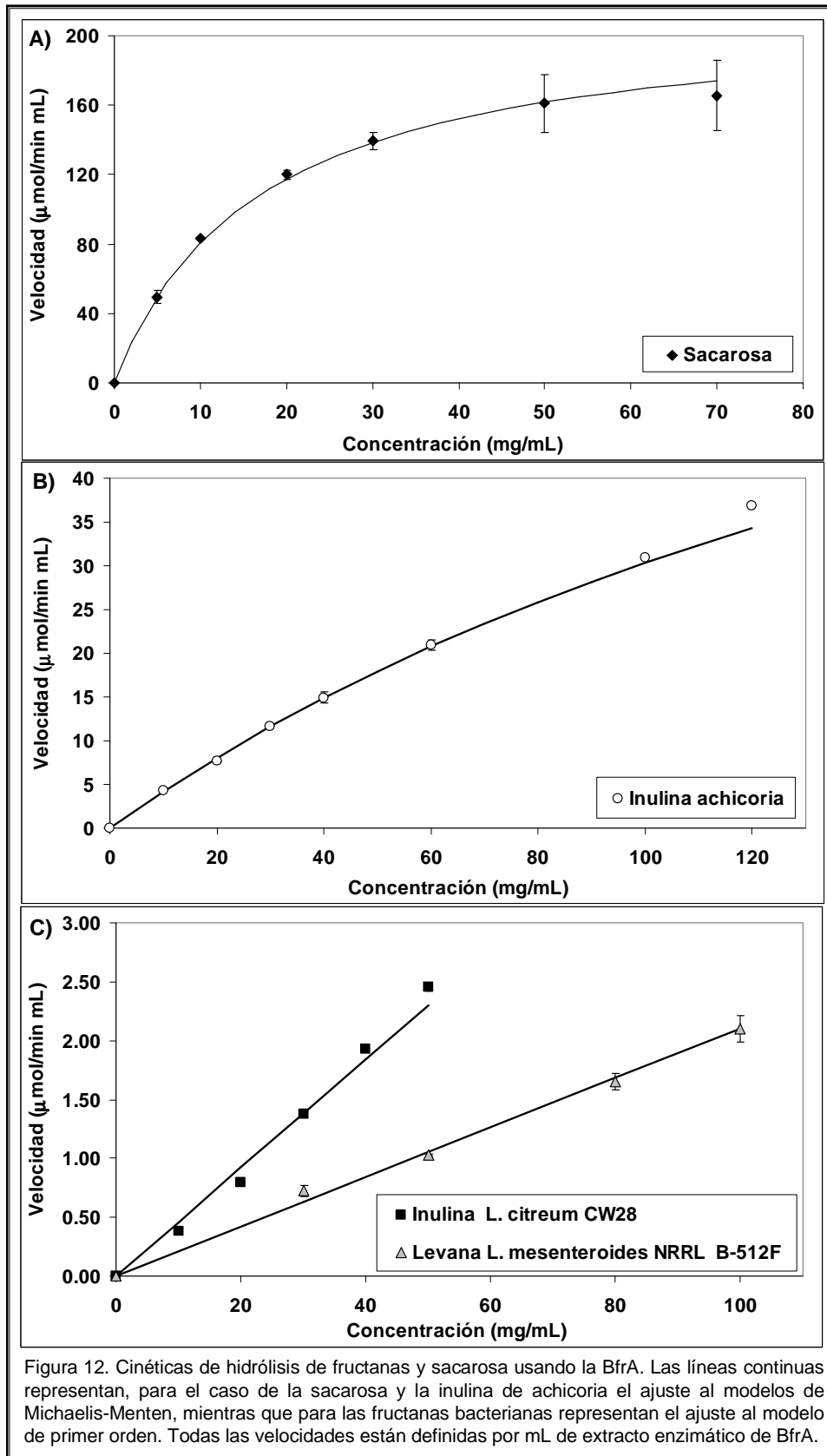
8.3.2. Zimogramas

La actividad enzimática de la BfrA expresada en *E. coli* BL21 se puede apreciar en el zimograma mostrado en la figura 11. En el cual se observa un halo de claridad a la altura de los 50 kDa que concuerda con el PM esperado reportado por W. Liebl y col [31] para esta enzima.



8.3.3. Hidrólisis de fructanas mediante la BfrA

De la misma manera que ocurrió con Fructozyme L, la cinética de hidrólisis de la sacarosa e inulina de achicoria por la BfrA se ajustó al modelo de Michaelis-Menten, mientras que las fructanas de origen bacteriano mostraron un comportamiento cinético de primer orden (figuras 12 y 13). Al tratar de ajustar los datos experimentales de las cinéticas de hidrólisis de las fructanas bacterianas al modelo de Michaelis-Menten (figura 14), se observa claramente para el caso de la inulina de *L. citreum*, que el modelo no se ajusta a los datos, sin embargo, para el caso de la levana de *L. mesenteroides* NRRL B-512F, aunque se observa que el modelo de Michaelis-Menten se ajusta un poco a los datos, el modelo de primer orden describe mejor la cinética.



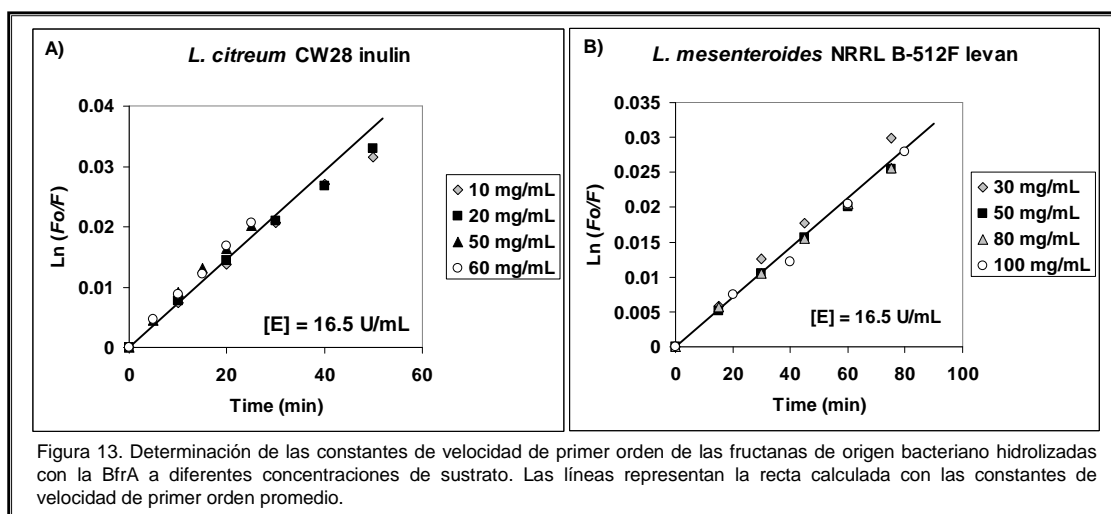


Figura 13. Determinación de las constantes de velocidad de primer orden de las fructanas de origen bacteriano hidrolizadas con la BfrA a diferentes concentraciones de sustrato. Las líneas representan la recta calculada con las constantes de velocidad de primer orden promedio.

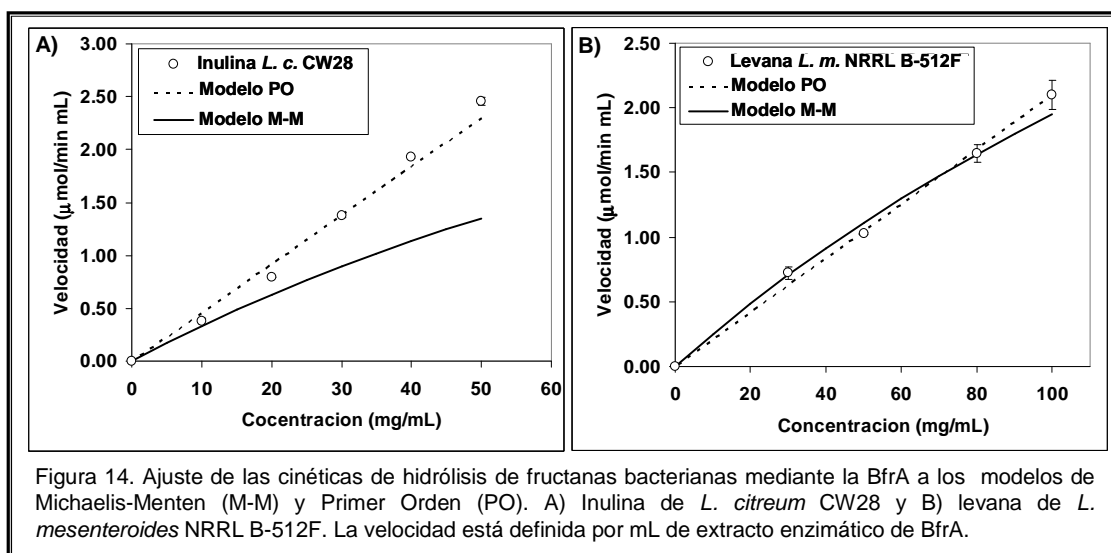


Figura 14. Ajuste de las cinéticas de hidrólisis de fructanas bacterianas mediante la BfrA a los modelos de Michaelis-Menten (M-M) y Primer Orden (PO). A) Inulina de *L. citreum* CW28 y B) levana de *L. mesenteroides* NRRL B-512F. La velocidad está definida por mL de extracto enzimático de BfrA.

Los parámetros cinéticos calculados para la sacarosa y la inulina de achicoria se muestran en la tabla XII, observándose que la K_m calculada para la sacarosa y la inulina de achicoria son de 48.5 y 26.7 mM respectivamente, valores muy cercanos a los reportados por Liebl y col [31] de 64 mM y 19 mM (Tabla XIII), aunque, la inulina empleada en los experimentos de Liebl y col. tenía un PM promedio de 5 kD, mientras que la inulina de achicoria utilizada en este trabajo posee un PM promedio de 8.3 kD.

Tabla XII. Parámetros cinéticos de sacarosa e inulina de achicoria hidrolizados por la BfrA calculados usando la representación gráfica de Lineweaver-Burk del modelo de Michaelis-Menten.

Sustrato	V_{max} (U/mL) ^(†)	K_m (mM)
Sacarosa	215.1 ± 8.1	48.4 ± 4.2
Inulina achicoria	97.6 ± 19.1	26.7 ± 5.8

† Velocidad definida por mL de extracto enzimático de BfrA.

Tabla XIII. Parámetros cinéticos de sacarosa e inulina hidrolizados por la BfrA reportados por Liebl y col. [31].

Sustrato	V_{max} (U/mg) ^(†)	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ s ⁻¹)
Sacarosa	3117	64	2.6 x 10 ³	4.1 x 10 ⁴
Inulina	710	19 ^(‡)	5.9 x 10 ²	3.1 x 10 ⁴

† Una unidad de actividad enzimática (U) está definida como la cantidad de enzima que libera una μmol de fructosa en un minuto de reacción

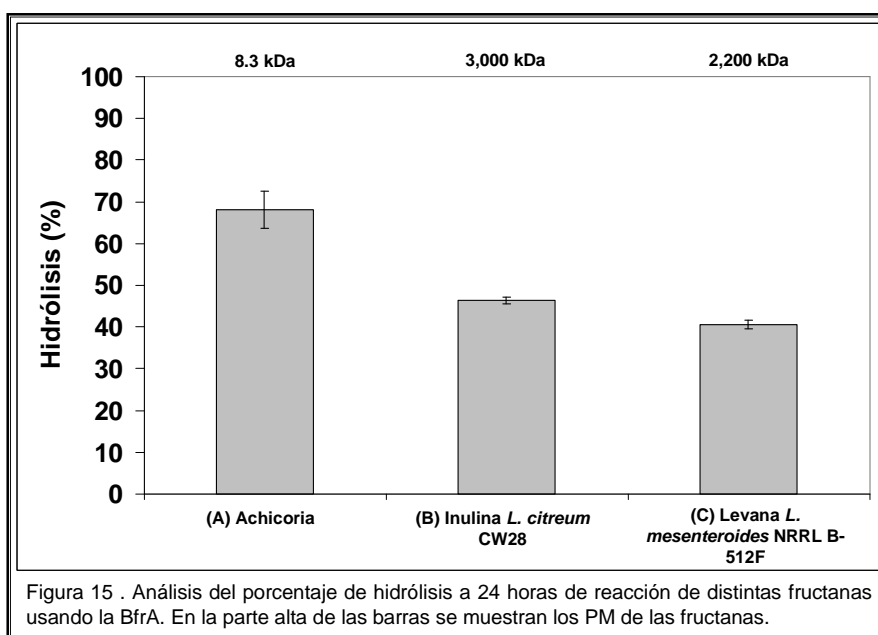
‡ La K_m y k_{cat} calculada para la inulina de achicoria es asumiendo que tiene un PM promedio de 5 kD.

Al igual que ocurrió con Fructozyme L, con la BfrA se reprodujo el hecho de que las constantes de velocidad de segundo orden y el nivel de hidrólisis de las diferentes fructanas fueran dependientes de la estructura y del PM del polímero (tabla XIV y figura 15), siendo la inulina de achicoria el mejor sustrato, seguido de la inulina de *L. citreum* CW28, y por último la levana microbiana. De acuerdo con los datos de las constantes de velocidad de segundo orden se encontró que la inulina de *L. citreum* CW28 (B) y la levana de *L. mesenteroides* NRRL B-512F (C) fueron hidrolizadas con una velocidad del 9.2 y 4.5 % respecto a la inulina de achicoria (A), guardando el mismo orden de preferencias por sustratos que Fructozyme L. En lo que a eficiencia catalítica se refiere, las diferencias mostradas entre la BfrA y Fructozyme L son debidas a que los mecanismos de reacción son diferentes, mientras que Fructozyme L es una mezcla de endo y exoinulinasas que actúan sinérgicamente, dando lugar a mayores velocidades de hidrólisis, la BfrA involucra sólo el ataque de una exoinulinasas sobre las fructanas. Sin embargo es interesante resaltar que la especificidad hacia el tipo de fructana se mantiene.

Tabla XIV. Comparación de constantes de velocidad de reacción usando la BfrA para hidrolizar diversas fructanas.

Fructana	Tipo de cinética	[E] (U/mL)	$k' \times 1000$ (min ⁻¹)	k'' fructana / k'' inulina de achicoria ^(†) (%)
(A) Inulina Achicoria	Michaelis-Menten	8.25	3.95	100
(B) Inulina <i>L. c.</i> CW28	Primer orden	16.5	0.73	9.2
(C) Levana <i>L. m.</i> NRRL B-512F	Primer orden	16.5	0.35	4.5

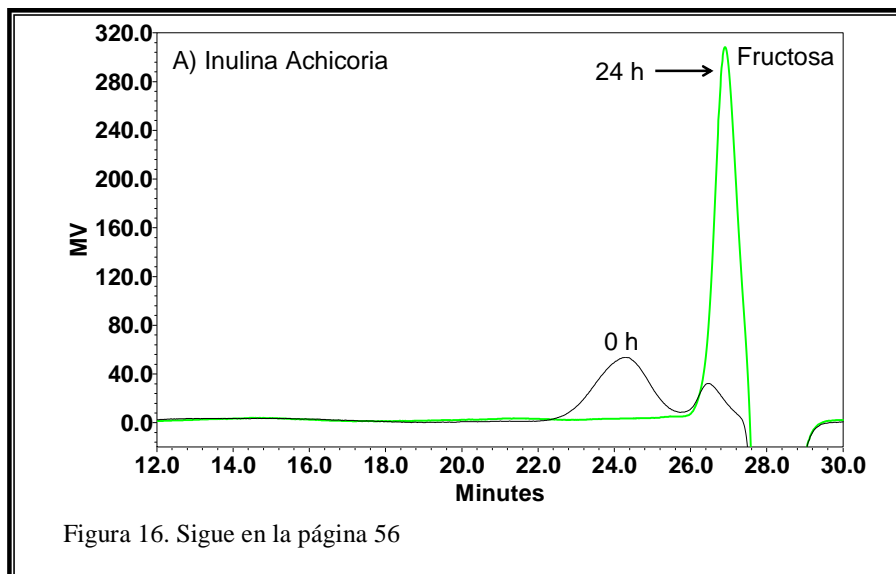
† Dado que no se purificó la BfrA, la concentración molar de enzima es desconocida, por lo que no se pueden obtener k'' . Por lo tanto se realizó una comparación relativa de las k'' de las diferentes fructanas respecto a la de inulina de achicoria, calculadas usando la concentración en U/mL de enzima utilizada.

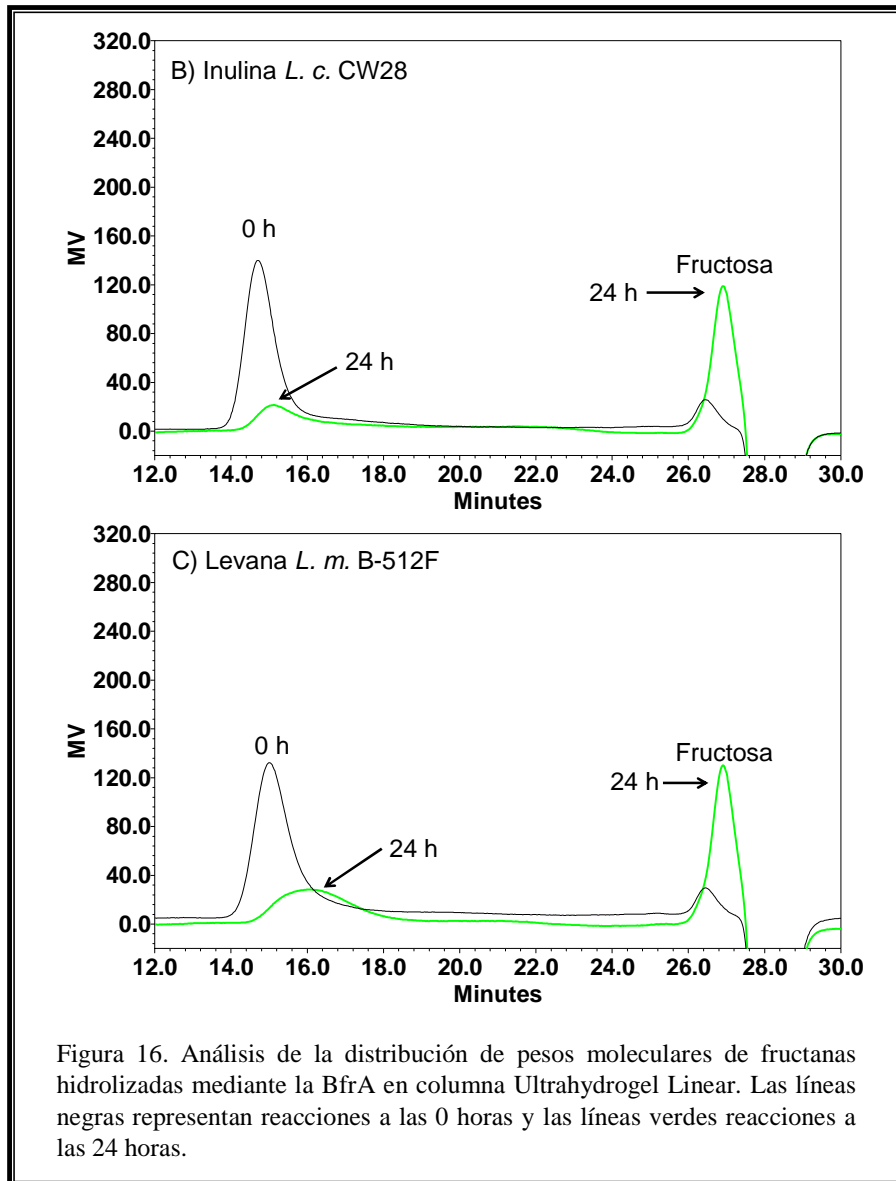


El análisis del porcentaje de hidrólisis en 24 horas de reacción con la BfrA (figura 15) muestra que el nivel de hidrólisis alcanzado, es menor para fructanas de alto PM y de estructura compleja. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con Fructozyme L, donde se observa una diferencia muy marcada entre los niveles de hidrólisis de las inulinas y las levanas, con la BfrA se obtiene un nivel de hidrólisis muy semejante entre la inulina de *L. citreum* CW28 y la levana de *L. mesenteroides* NRRL B-512F, debido a que los mecanismos de reacción de los dos sistemas enzimáticos utilizados son diferentes, y por

lo tanto, el ataque de la mezcla de inulinasas de Fructozyme L provoca una mayor diferencia entre los niveles de hidrólisis de la inulina de *L. citreum* CW28 y la levana de *L. mesenteroides* NNRL B-512F que el sólo ataque de la BfrA. Sin duda en este caso, al igual que ocurre con Fructozyme L, existe una hidrólisis preferente de los enlaces β 2-1, lo que explica la mayor hidrólisis obtenida conforme disminuye la proporción de enlaces β 2-6, alcanzándose 68% en el caso de la inulina de achicoria y un 41% de hidrólisis para la levana.

Los productos finales de hidrólisis durante 24 horas de reacción se analizaron por HPLC mediante una columna de permeación en gel para ver la distribución de PM (figura 16). De igual forma que ocurrió con el análisis realizado con Fructozyme L los patrones hidrolíticos se mantienen, observándose como la inulina de achicoria fue hidrolizada en mayor proporción, siendo las fructanas bacterianas más resistentes a la hidrólisis.





CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se muestra como las cinéticas de hidrólisis de fructanas realizadas con Fructozyme L y la BfrA generan parámetros cinéticos que son característicos de la estructura y el PM de la fructana. Al comparar las constantes de velocidad de primer y segundo orden, se observa cómo con las fructanas de bajo PM (origen vegetal) se obtienen las mayores velocidades de hidrólisis, siendo las fructanas de alto PM (origen bacteriano) más difíciles de hidrolizar. Aunque las V_{max} calculadas para las fructanas vegetales hidrolizadas con Fructozyme L son virtualmente iguales, la comparación de sus K_m demuestra que la afinidad de Fructozyme L por enlaces β 2-1 es la más alta, ya que, la inulina de achicoria (fructana lineal sin ramificaciones con un PM promedio de 8.3 kDa) presenta una K_m 4 veces menor que la K_m de agavina (fructana mezclada con un PM promedio de 6.2 kDa).

En general la inulina de achicoria fue la fructana con la que se obtuvieron las mayores velocidades de hidrólisis, por esta razón se usó como fructana de referencia al realizar las comparaciones de las constantes de velocidad de segundo orden, de lo que se puede concluir que para el caso de las inulinas, la de *L. citreum* fue hidrolizada con una velocidad tan solo de 6.5% de la velocidad con la que se hidroliza la de achicoria. En lo referente a las fructanas bacterianas, la inulina de *L. citreum* fue hidrolizada a mayor velocidad, y al comparar las levanas, la producida por *B. subtilis* se hidrolizó a mayor velocidad debido posiblemente a la presencia de levana de bajo PM. Estos resultados muestran como Fructozyme L tiene una preferencia hidrolítica hacia estructuras de bajo PM con enlaces β 2-1, por lo que estructuras de mayor PM y con la presencia de enlaces β 2-6 resultan más difíciles de hidrolizar, comportamiento que resultó similar en el estudio realizado con la BfrA. Esto permite plantear que mediante un estudio del comportamiento cinético de hidrólisis, es posible obtener evidencia de forma sencilla y rápida sobre qué tipo de fructana está presente en una determinada muestra problema; la hidrólisis permite particularmente diferenciar entre inulinas y levanas que son producidas por una gran variedad de microorganismos.

En particular, este tipo de ensayos hidrolíticos, podrían funcionar como una primera aproximación a la estructura de una fructana antes de llevar a cabo estudios más complejos, ya que, mediante un estudio cinético realizado con una enzima comercial como Fructozyme L o una exoinulinasa como la BfrA a una fructana problema de estructura desconocida, y usando como referencia fructanas de estructura conocida, se puede inferir algunos elementos relacionados con su estructura. Este análisis sería de particular ventaja en la búsqueda de cambios de especificidad en las reacciones de síntesis de fructanas mediante enzimas modificadas por mutagénesis sitio dirigida.

Es importante hacer notar que la hidrólisis de levanas fue menor que la de inulinas en 24 horas de hidrólisis, alcanzándose niveles de conversión de alrededor del 50% usando el producto Fructozyme L. Esta observación se debe tomar en cuenta cuando se están realizando cuantificaciones de fructanas en alimentos, incluso es una observación que omiten los kits para la determinación de fructanas en alimentos.

Una característica de fundamental importancia que deben poseer las inulinasas para su aplicación a nivel industrial es resistir temperaturas mayores a los 60 °C para evitar contaminaciones y aumentar la solubilidad de la fructana, siendo la BfrA la inulinasa más termorresistente reportada hasta la fecha con una temperatura óptima de hidrólisis de 90-95 °C [31]. Un estudio reciente ha mostrado que durante el proceso tradicional para la hidrólisis de agavinas en hornos de ladrillo existe una pérdida del 6% de etanol ya que una cantidad considerable de fructana no es hidrolizada [3]. El uso de otros métodos de hidrólisis como autoclaves ha sido utilizada, sin embargo, esto resulta en la pérdida de compuestos esenciales que dan las características organolépticas al tequila, por lo que se deben buscar métodos que ayuden en la hidrólisis y que se adapten al proceso tradicional. En el presente trabajo se demostró igualmente la capacidad que tiene la BfrA para hidrolizar inulinas y levanas de alto y bajo PM, alcanzándose niveles de conversión muy semejantes para la inulina de *L. citreum* CW28 y la levana de *L. mesenteroides* NRRL B-512F en 24 horas de hidrólisis, lo que nos permite concluir que esta enzima posee un alto potencial para su implementación como biocatalizador en la industria tequilera, ya que además, los jugos que salen de los hornos tienen una

temperatura que varía entre los 66.5 y 78.5 °C durante la etapa de cocción, por lo que no se requeriría de una etapa más de enfriamiento para adaptar al biocatalizador pudiéndose terminar la hidrólisis de los jugos del agave.

Los resultados de esta investigación fueron sometidos para su publicación en la revista *Journal of Food Chemistry* con el título: “Enzymatic hydrolysis of fructans by two β -fructosidase preparations”, anexado al final del escrito.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

1. Ritsema, T. and Smeekens, S. (2003). Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology* 6 (3) 223-230.
2. Vijn, I. and Smeekens, S. (1999). Fructan: More than a reserve carbohydrate? *Plant Physiology* 120 (2) 351-359.
3. Waleckx, E., Gschaedler, A., Colonna-Ceccaldi, B., and Monsan, P. (2008). Hydrolysis of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul during the cooking step in a traditional tequila elaboration process. *Food Chemistry* 108 (1) 40-48.
4. Mancilla-Margalli, N.A. and Lopez, M.G. (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyliroton* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (20) 7832-7839.
5. Hendry, J.A.F. (1993). Evolutionary origins and natural functions of fructans - a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytologist* 123 3-14.
6. Korakli, M. and Vogel, R.F. (2006). Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycosyltransferases and therapeutic potential of their synthesised glycans. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71 (6) 790-803.
7. Inness, K.R. (1999). Inulin and Oligofructose: What Are They? *The American Society for Nutritional Sciences* 129 1402S-1406S.
8. Roberfroid, M.B. (2005). Introducing inulin-type fructans. *British Journal of Nutrition* 93 S13-S25.
9. Roberfroid, M. (2007). Prebiotics: The concept revisited. *Journal of Nutrition* 137 (3) 830S-837S.
10. Calazans, G.M.T., Lima, R.C., de Franca, F.P., and Lopes, C.E. (2000). Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. *International Journal of Biological Macromolecules* 27 (4) 245-247.
11. Yoon, E.J., Yoo, S.H., Cha, J.H., and Lee, H.G. (2004). Effect of levan's branching structure on antitumor activity. *International Journal of Biological Macromolecules* 34 (3) 191-194.
12. Kim, K.H., Chung, C.B., Kim, Y.H., Kim, K.S., Han, C.S., and Kim, C.H. (2005). Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *Journal of Cosmetic Science* 56 (6) 395-406.
13. Pandey, A., Soccol, C.R., Selvakumar, P., Soccol, V.T., Krieger, N., and Fontana, J.D. (1999). Recent developments in microbial inulinases - Its production,

- properties, and industrial applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 81 (1) 35-52.
14. Vandamme, E.J. and Derycke, D.C. (1983). Microbial Inulinases: Fermentation Process, Properties, and Applications. *Advances in Applied Microbiology* 29 139-175.
 15. Hanover, L.M. and White, J.S. (1993). Manufacturing, composition, and applications of fructose. *American Journal of Clinical Nutrition* 58 724S-732S.
 16. Secretaría de economía (2005). Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2005, Bebidas alcohólicas-Tequila-Especificaciones. *Diario Oficial de la Federación*
 17. Cedeño, M. (1995). Tequila Production. *Critical Reviews in Biotechnology* 15 (1) 1-11.
 18. Secretaría de economía (1994). Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994, Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones. *Diario Oficial de la Federación*
 19. Leon-Rodriguez, A., Gonzalez-Hernandez, L., De la Rosa, A.P.B., Escalante-Minakata, P., and Lopez, M.G. (2006). Characterization of volatile compounds of mezcal, an ethnic alcoholic beverage obtained from *Agave salmiana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (4) 1337-1341.
 20. Secretaría de economía (2004). Norma Oficial Mexicana NOM-168-SCFI-2004, Bebidas alcohólicas, Bacanora, Especificaciones de elaboración, envasado y etiquetado. *Diario Oficial de la Federación*
 21. Secretaría de economía (2004). Norma Oficial Mexicana NOM-159-SCFI-2004, Bebidas alcohólicas-Sotol-Especificaciones y métodos de prueba. *Diario Oficial de la Federación*
 22. Jin, Z.Y., Wang, J., Jiang, B., and Xu, X.M. (2005). Production of inulooligosaccharides by endoinulinases from *Aspergillus ficuum*. *Food Research International* 38 (3) 301-308.
 23. Kim, H.C., Kim, H.J., Choi, W.B., and Nam, S.W. (2006). Inulooligosaccharide production from inulin by *Saccharomyces cerevisiae* strain displaying cell-surface endoinulinase. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 16 (3) 360-367.
 24. Skowronek, M. and Fiedurek, J. (2006). Purification and properties of extracellular endoinulinase from *Aspergillus niger* 20 OSM. *Food Technology and Biotechnology* 44 (1) 53-58.
 25. Diaz, E.G., Catana, R., Ferreira, B.S., Luque, S., Fernandes, P., and Cabral, J.M.S. (2006). Towards the development of a membrane reactor for enzymatic inulin hydrolysis. *Journal of Membrane Science* 273 (1-2) 152-158.

26. Gill, P.K., Manhas, R.K., and Singh, P. (2006). Hydrolysis of inulin by immobilized thermostable extracellular exoinulinase from *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Food Engineering* 76 (3) 369-375.
27. Rocha, J.R., Catana, R., Ferreira, B.S., Cabral, J.M.S., and Fernandes, P. (2006). Design and characterisation of an enzyme system for inulin hydrolysis. *Food Chemistry* 95 (1) 77-82.
28. Sirisansaneeyakul, S., Worawuthiyanan, N., Vanichsriratana, W., Srinophakun, P., and Chisti, Y. (2007). Production of fructose from inulin using mixed inulinases from *Aspergillus niger* and *Candida guilliermondii*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 23 (4) 543-552.
29. Singh, P. and Gill, P.K. (2006). Production of inulinases: Recent advances. *Food Technology and Biotechnology* 44 (2) 151-162.
30. Gill, P.K., Manhas, R.K., and Singh, P. (2006). Comparative analysis of thermostability of extracellular inulinase activity from *Aspergillus fumigatus* with commercially available (Novozyme) inulinase. *Bioresource Technology* 97 (2) 355-358.
31. Liebl, W., Brem, D., and Gotschlich, A. (1998). Analysis of the gene for beta-fructosidase (invertase, inulinase) of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*, and characterisation of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50 (1) 55-64.
32. Ciucanu, I. (2006). Per-O-methylation reaction for structural analysis of carbohydrates by mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 576 (2) 147-155.
33. Lopez, M.G., Mancilla-Margalli, N.A., and Mendoza-Diaz, G. (2003). Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (27) 7835-7840.
34. van Loo, J., Coussement, P., de Leenheer, L., Hoebregs, H., and Smits, G. (1995). On the Presence of Inulin and Oligofructose as Natural Ingredients in the Western Diet. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35 (6) 525-552.
35. Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., and Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 12 (2-3) 163-171.
36. Sánchez-Marroquín, A. and Hope, P.H. (1953). Agave Juice, Fermentation and Chemical Composition Studies of Some Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1 (3) 246-249.
37. Tiekink, M., Kaditzky, S., Valcheva, R., Korakli, M., Vogel, R.F., and Ganzle, M.G. (2005). Extracellular homopolysaccharides and oligosaccharides from intestinal lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology* 99 (3) 692-702.

38. Tiekling, M., Korakli, M., Ehrmann, M.A., Ganzle, M.G., and Vogel, R.F. (2003). In situ production of exopolysaccharides during sourdough fermentation by cereal and intestinal isolates of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (2) 945-952.
39. Di Cagno, R., De Angelis, M., Limitone, A., Minervini, F., Carnevali, P., Corsetti, A., Gaenzle, M., Ciati, R., and Gobbetti, M. (2006). Glucan and fructan production by sourdough *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (26) 9873-9881.
40. van Hijum, S.A.F.T., Geel-Schutten, G.H., Rahaoui, H., van der Maarel, M.J.E.C., and Dijkhuizen, L. (2002). Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (9) 4390-4398.
41. van Hijum, S.A.F.T., Bonting, K., van der Maarel, M.J.E.C., and Dijkhuizen, L. (2001). Purification of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 and characterization of the levan produced. *Fems Microbiology Letters* 205 (2) 323-328.
42. Dal Bello, F., Walter, J., Hertel, C., and Hammes, W.P. (2001). In vitro study of prebiotic properties of Levan-type exopolysaccharides from lactobacilli and non-digestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis. *Systematic and Applied Microbiology* 24 (2) 232-237.
43. Olivares-Illana, V., Wacher-Rodarte, C., Le Borgne, S., and Lopez-Munguia, 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. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 28 (2) 112-117.
44. Olvera, C., Centeno-Leija, S., and Lopez-Munguia, A. (2007). Structural and functional features of fructansucrases present in *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 92 (1) 11-20.
45. Morales-Arrieta, S., Rodriguez, M.E., Segovia, L., Lopez-Munguia, A.G., and Olvera-Carranza, C. (2006). Identification and functional characterization of levS, a gene encoding for a levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Gene* 376 (1) 59-67.
46. Ebisu, S., Kato, K., Kotani, S., and Misaki, A. (1975). Structural Differences in Fructan Elaborated by *Streptococcus mutans* and *Strep. salivarius*. *Journal of Biochemistry* 78 879-887.
47. Hernandez, L., Arrieta, J., Menendez, C., Vazquez, R., Coego, A., Suarez, V., Selman, G., Petitglatron, M.F., and Chambert, R. (1995). Isolation and

- Enzymatic-Properties of Levansucrase Secreted by *Acetobacter-Diazotrophicus* Srt4, A Bacterium Associated with Sugar-Cane. *Biochemical Journal* 309 113-118.
48. Pabst, M.J. (1977). Levan and Levansucrase of *Actinomyces viscosus*. *Infection and Immunity* 15 (2) 518-526.
 49. Feingold, D.S. and Gehatia, M. (1957). The structure and Properties of Levan, a Polymer of D-Fructose Produced by Cultures and Cell-Free Extracts of *Aerobacter levanicum*. *Journal of Polymer Science* 13 783-790.
 50. Perez Oseguera, M.A., Guereca, L., and Lopez-Munguia, A. (1996). Properties of levansucrase from *Bacillus circulans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45 465-471.
 51. Han, Y.W. (1989). Levan production by *Bacillus polymyxa*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 4 (6) 447-452.
 52. Tanaka, T., Oi, S., and Yamamoto, T. (1980). The Molecular Structure of Low and High Molecular Weight Levans Synthesized by Levansucrase. *Journal of Biochemistry* 87 297-303.
 53. Shih, I.L., Yu, Y.T., Shieh, C.J., and Hsieh, C.Y. (2005). Selective production and characterization of levan by *Bacillus subtilis* (natto) Takahashi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (21) 8211-8215.
 54. Wada, T., Ohguchi, M., and Iwai, Y. (2003). A novel enzyme of *Bacillus* sp 217C-11 that produces inulin from sucrose. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 67 (6) 1327-1334.
 55. Gross, M., Geier, G., Rudolph, K., and Geider, K. (1992). Levan and Levansucrase synthesized by the firelight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 40 371-381.
 56. Oh, I.K., Yoo, S.H., Bae, I.Y., Cha, J.H., and Lee, H.G. (2004). Effects of *Microbacterium laevaniformans* Levans molecular weight on cytotoxicity. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 14 (5) 985-990.
 57. Jang, K.H., Jang, E.K., Kim, S.H., Kim, I.H., Kang, S.A., Koh, I., Park, Y.I., Kim, Y.J., Ha, S.D., and Kim, C.H. (2006). High-level production of low-branched levan from *Pseudomonas aurantiaca* S-4380 for the production of di-beta-D-fructofuranose dianhydride IV. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 16 (1) 102-108.
 58. Gross, M. and Rudolph, K. (1987). Studies on the Extracellular Polysaccharides (EPS) Produced in vitro by *Pseudomonas phaseolicola* II. Characterization of Levan, Alginate, and 'LPS'. *Journal of Phytopathology* 119 206-215.

59. Ohtsuka, K., Hino, S., Fukushima, T., Ozawa, O., Kanematsu, T., and Uchida, T. (1992). Characterization of Levansucrase from *Rahnella aquatilis* JCM-1683. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 56 (9) 1373-1377.
60. Dawes, E.A. and Ribbons, D.W. (1966). Sucrose Utilization by *Zymomonas mobilis*: Formation of a Levan. *Biochemical Journal* 98 804-812.
61. Bonnet, G.D., Sims, I.M., John, J.A.St., and Simpson, R.J. (1994). Purification and Characterization of Fructans with beta-2,1- and beta-2,6-Glycosidic Linkages Suitable for Enzyme Studies. *New Phytologist* 127 (2) 261-269.
62. Chatterton, N.J. and Harrison, P.A. (1997). Fructan oligomers in *Poa ampla*. *New Phytologist* 136 (1) 3-10.
63. Ernst, M.K., Chatterton, N.J., Harrison, P.A., and Matitschka, G. (1998). Characterization of fructan oligomers from species of the genus *Allium* L. *Journal of Plant Physiology* 153 (1-2) 53-60.
64. Shiomi, N. (1993). Structure of fructopolysaccharide (asparagosin) from roots of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *New Phytologist* 123 263-270.
65. Livingston, D.P., Chatterton, N.J., and Harrison, P.A. (1993). Structure and quantity of fructan oligomers in oat (*Avena* spp.). *New Phytologist* 123 725-724.
66. Campbell, J.M., Fahey, G.C., and Wolf, B.W. (1997). Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *Journal of Nutrition* 127 (1) 130-136.
67. Gibson, G.R. and Wang, X. (1994). Bifidogenic properties of different types of fructo-oligosaccharides. *Food Microbiology* 11 (6) 491-498.
68. Kleessen, B., Hartmann, L., and Blaut, M. (2001). Oligofructose and long-chain inulin: influence on the gut microbial ecology of rats associated with a human faecal flora. *British Journal of Nutrition* 86 (2) 291-300.
69. Roberfroid, M.B., Van Loo, J.A.E., and Gibson, G.R. (1998). The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *Journal of Nutrition* 128 (1) 11-19.
70. Wu, X.M., Dai, H., Huang, L.X., Gao, X.M., Tsim, K.W.K., and Tu, P.F. (2006). A fructan, from radix ophiopogonis, stimulates the proliferation of cultured lymphocytes: Structural and functional analyses. *Journal of Natural Products* 69 (9) 1257-1260.
71. Chen, X.M. and Tian, G.Y. (2003). Structural elucidation and antitumor activity of a fructan from *Cyathula officinalis* Kuan. *Carbohydrate Research* 338 (11) 1235-1241.

72. Calazans, G.M.T., Lopes, C.E., Lima, R.M.O.C., and deFranca, F.P. (1997). Antitumour activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. *Biotechnology Letters* 19 (1) 19-21.
73. Leibovici, J. and Stark, Y. (1984). Direct antitumor effect of the polysaccharide levan in mice: effects of drug concentration and time and temperature of incubation. *Journal of the National Cancer Institute* 72 (6) 1417-1420.
74. Shallenberger, R.S. (1982). *ADVANCED SUGAR CHEMISTRY Principles of Sugar Stereochemistry*. First printing 258-261.
75. Watson, S.A. and Ramstad, P.E. (1999). *Corn: Chemistry and Technology*. Fourth printing 523-524.
76. Urias-Silvas, J.E., Cani, P.D., Delmee, E., Neyrinck, A., Lopez, M.G., and Delzenne, N.M. (2008). Physiological effects of dietary fructans extracted from *Agave tequilana* Gto. and *Dasyliroton* spp. *British Journal of Nutrition* 99 254-261.
77. Avigad, G. and Bauer, S. (1966). Fructan Hydrolases. *Methods in Enzymology* 8 621-628.
78. Verhaest, M., Lammens, W., Le Roy, K., De Ranter, C.J., Van Laere, A., Rabijns, A., and Van den Ende, W. (2007). Insights into the fine architecture of the active site of chicory fructan 1-exohydrolase: 1-kestose as substrate vs sucrose as inhibitor. *New Phytologist* 174 (1) 90-100.
79. Arand, M., Golubev, A.M., Neto, J.R.B., Polikarpov, I., Wattiez, R., Korneeva, O.S., Eneyskaya, E.V., Kulminskaya, A.A., Shabalin, K.A., Shishliannikov, S.M., Chepurnaya, O.V., and Neustroev, K.N. (2002). Purification, characterization, gene cloning and preliminary X-ray data of the exo-inulinase from *Aspergillus awamori*. *Biochemical Journal* 362 131-135.
80. Kochhar, A., Gupta, A.K., and Kaur, N. (1999). Purification and immobilisation of inulinase from *Aspergillus candidus* for producing fructose. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79 (4) 549-554.
81. Ettalibi, M. and Baratti, J.C. (1987). Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinases and endoinulinases of *Aspergillus ficuum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 26 13-20.
82. Gill, P.K., Manhas, R.K., and Singh, P. (2006). Purification and properties of a heat-stable exoinulinase isoform from *Aspergillus fumigatus*. *Bioresource Technology* 97 (7) 894-902.
83. Gupta, A.K., Gill, A., and Kaur, N. (1998). A HgCl₂ insensitive and thermally stable inulinase from *Aspergillus oryzae*. *Phytochemistry* 49 (1) 55-58.

84. Kwon, H.J., Jeon, S.J., You, D.J., Kim, K.H., Jeong, Y.K., Kim, Y.H., Kim, Y.M., and Kim, B.W. (2003). Cloning and characterization of an exoinulinase from *Bacillus polymyxa*. *Biotechnology Letters* 25 (2) 155-159.
85. Kim, J.H., Kwak, Y.J., Lee, J.T., Choi, S.Y., and Lee, J.S. (2002). Purification and Characterization of an Intracellular Inulinase from *Bacillus sphaericus* 188-1. *NUTRACEUTICALS AND FOOD* 7 (4) 421-426.
86. Wanker, E., Huber, A., and Schwab, H. (1995). Purification and Characterization of the *Bacillus-Subtilis* Levanase Produced in *Escherichia-Coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (5) 1953-1958.
87. Vullo, D.L., Coto, C.E., and Sineriz, F. (1991). Characteristics of an inulinase produced by *Bacillus subtilis* 430A, a strain isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbacea* (Vell Rusby). *Applied and Environmental Microbiology* 57 (8) 2392-2394.
88. Blatch, G.L. and Woods, D.R. (1993). Molecular Characterization of a Fructanase Produced by *Bacteroides fragilis* BF-1. *Journal of Bacteriology* 175 (10) 3058-3066.
89. Muramatsu, K., Onodera, S., Onodera, S., and Shiomi, N. (1993). Purification and Some Properties of beta-Fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 57 (10) 1681-1685.
90. Imamura, L., Hisamitsu, K., and Kobashi, K. (1994). Purification and characterization of beta-fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis*. *Biological Pharmaceutical Bulletin* 17 (5) 596-602.
91. Warchol, M., Perrin, S., Grill, J.P., and Schneider, F. (2002). Characterization of a purified beta-fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697. *Letters in Applied Microbiology* 35 (6) 462-467.
92. Ehrmann, M.A., Korakli, M., and Vogel, R.F. (2003). Identification of the gene for beta-fructofuranosidase of *Bifidobacterium lactis* DSM10140(T) and characterization of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Current Microbiology* 46 (6) 391-397.
93. Xiao, R., Tanida, M., and Takao, S. (1989). Purification and Characteristics of Two Exoinulinases from *Chrysosporium pannorum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 67 (5) 331-334.
94. Tsujimoto, Y., Watanabe, A., Nakano, K., Watanabe, K., Matsui, H., Tsuji, K., Tsukihara, T., and Suzuki, Y. (2003). Gene cloning, expression, and crystallization of a thermostable exo-inulinase from *Geobacillus stearothermophilus* KP1289. *Applied Microbiology and Biotechnology* 62 (2-3) 180-185.

95. Menendez, C., Hernandez, L., Selman, G., Mendoza, M.F., Hevia, P., Sotolongo, M., and Arrieta, J.G. (2002). Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of an exo-levanase gene from the endophytic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* SRT4. *Current Microbiology* 45 (1) 5-12.
96. Cruzguerrero, A., Garciapena, I., Barzana, E., Garciagaribay, M., and Gomezruiz, L. (1995). *Kluyveromyces-Marxianus* Cdbb-L-278 - A Wild Inulinase Hyperproducing Strain. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 80 (2) 159-163.
97. Rouwenhorst, R.J., Visser, L.E., Van der Baan, A.A., Scheffers, A., and van Dijken, J.P. (1998). Production, Distribution, and Kinetic Properties of Inulinase in Continuous Cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Applied and Environmental Microbiology* 54 (5) 1131-1137.
98. Kushi, R.T., Monti, R., and Contiero, J. (2000). Production, purification and characterization of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 25 (2) 63-69.
99. Cruz-Guerrero, A.E., Olvera, J.L., Garcia-Garibay, M., and Gomez-Ruiz, L. (2006). Inulinase-hyperproducing strains of *Kluyveromyces* sp isolated from aguamiel (Agave sap) and pulque. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 22 (2) 115-117.
100. Paludan-Muller, C., Gram, L., and Rattray, F.P. (2002). Purification and characterisation of an extracellular fructan beta-fructosidase from a *Lactobacillus pentosus* strain isolated from fermented fish. *Systematic and Applied Microbiology* 25 (1) 13-20.
101. Muller, M. and Seyfarth, W. (1997). Purification and substrate specificity of an extracellular fructanhydrolase from *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* P 4134. *New Phytologist* 136 (1) 89-96.
102. Pessoni, R.A.B., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., and Braga, M.R. (1999). Extracellular inulinases from *Penicillium janczewskii*, a fungus isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbacea* (Asteraceae). *Journal of Applied Microbiology* 87 (1) 141-147.
103. Moriyama, S., Akimoto, H., Suetsugu, N., Kawasaki, S., Nakamura, T., and Ohta, K. (2002). Purification and properties of an extracellular exoinulinase from *Penicillium* sp strain TN-88 and sequence analysis of the encoding gene. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 66 (9) 1887-1896.
104. Gong, F., Sheng, J., Chi, Z.M., and Li, J. (2007). Inulinase production by a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the crude inulinase. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 34 (3) 179-185.

105. Kwon, Y.M., Kim, H.Y., and Choi, Y.J. (2000). Cloning and characterization of *Pseudomonas mucidolens* exoinulinase. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 10 (2) 238-243.
106. Kim, M.K., Kim, Y.H., Kim, H.R., Kim, B.I., Byun, S.M., and Uhm, T.B. (1994). THERMAL STABILITY OF AN ACIDIC INULINASE FROM *Scytalidium acidophilum*. *Biotechnology Letters* 16 (9) 965-966.
107. Burne, R.A., Schilling, K., Bowen, W.H., and Yasbin, R.E. (1987). Expression, Purification, and Characterization of an Exo- β -D-Fructosidase of *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology* 169 (10) 4507-4517.
108. Sharma, A.D. and Gill, P.K. (2007). Purification and characterization of heat-stable exo-inulinase from *Streptomyces* sp. *Journal of Food Engineering* 79 (4) 1172-1178.
109. Song, E.K., Kim, H., Sung, H.K., and Cha, J. (2002). Cloning and characterization of a levanbiohydrolase from *Microbacterium laevaniformans* ATCC 15953. *Gene* 291 (1-2) 45-55.
110. Chaudhary, A., Gupta, L.K., Gupta, J.K., and Banerjee, U.C. (1996). Purification and properties of levanase from *Rhodotorula* sp. *Journal of Biotechnology* 46 (1) 55-61.
111. Saito, K., Oda, Y., Tomita, F., and Yokota, A. (2003). Molecular cloning of the gene for 2,6-beta-D-fructan 6-levanbiohydrolase from *Streptomyces exfoliatus* F3-2. *Fems Microbiology Letters* 218 (2) 265-270.
112. Murakami, H., Muroi, H., Kuramoto, T., Tamura, Y., Mizutani, K., Nakano, H., and Kitahata, S. (1990). Purification and some properties of a levanase from *Streptomyces* sp. No. 7-3. *Agricultural and Biological Chemistry* 54 (9) 2247-2255.
113. Kang, S.I., Chang, Y.J., Oh, S.J., and Kim, S.I. (1998). Purification and properties of an endo-inulinase from an *Arthrobacter* sp. *Biotechnology Letters* 20 (10) 983-986.
114. Uhm, T.B., Chung, M.S., Lee, S.H., Gourronc, F., Housen, I., Kim, J.H., Van Beeumen, J., Haye, B., and Vandenhaute, J. (1999). Purification and characterization of *Aspergillus ficuum* endoinulinase. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 63 (1) 146-151.
115. Xiao, R., Tanida, M., and Takao, S. (1989). Purification and some properties of endoinulinase from *Chrysosporium pannorum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 67 (4) 244-248.

116. Onodera, S. and Shiomi, N. (1998). Purification and Substrate Specificity of endo-Typz Inulinase from *Penicillium purpurogenum*. *Agricultural and Biological Chemistry* 52 (10) 2569-2576.
117. Nakamura, T., Shitara, A., Matsuda, S., Matsuo, T., Suiko, M., and Ohta, K. (1997). Production, purification and properties of an endoinulinase of *Penicillium* sp. TN-88 that liberates inulotriose. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 84 (4) 313-318.
118. Kim, D.H., Choi, Y.J., Song, S.K., and Yun, J.W. (1997). Production of inulo-oligosaccharides using endo-inulinase from a *Pseudomonas* sp. *Biotechnology Letters* 19 (4) 369-371.
119. Cho, Y.J. and Yun, J.W. (2002). Purification and characterization of an endoinulinase from *Xanthomonas oryzae* No.5. *Process Biochemistry* 37 (11) 1325-1331.
120. Igarashi, T., Takahashi, M., Yamamoto, A., Etoh, Y., and Takamori, K. (1987). Purification and Characterization of Levanase from *Actinomyces viscosus* ATCC 19246. *Infection and Immunity* 55 (12) 3001-3005.
121. Murakami, H., Kuramoto, T., Mizutani, K., Kakano, H., and Kitahata, S. (1992). Purification and Some Properties of a New Levanase from *Bacillus* sp. No. 71. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 56 (4) 608-613.
122. Miasnikov, A.N. (1997). Characterization of a novel endo-levanase and its gene from *Bacillus* sp. L7. *Fems Microbiology Letters* 154 (1) 23-28.
123. Lim, Y.S., Kang, S.K., Lee, S.O., Lee, J.D., and Lee, T.H. (1998). Purification and characterization of a levanase from *Streptomyces* sp. 366L. *Journal of Biotechnology* 61 (1) 33-41.
124. Andersen, R. and Sorensen, A. (1999). An enzymatic method for the determination of fructans in foods and food products - Comparison of the results by high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *European Food Research and Technology* 210 (2) 148-152.
125. Megazyme (2008). Fructan assay procedure for the measurement of fructo-oligosaccharides (FOS) and fructan polysaccharide. (**Catalogue Nuber K-FRUC**)
126. Ortiz-Soto, M.E., Olivares-Illana, V., and Lopez-Munguia, A. (2004). Biochemical properties of inulosucrase from *Leuconostoc citreum* CW28 used for inulin synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation* 22 (4) 275-281.
127. Ortiz-Soto, M.E., Rivera, M., Rudiño-Piñero, E., Olvera, C., and López-Munguía, A. (2008). Selected Mutations in *Bacillus subtilis* Levansucrase Semiconserved

- Regions Affecting Its Biochemical Properties. Protein Engineering Design and Selection In Press
128. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227 680-685.
 129. Miller, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* 31 426-428.
 130. Simms, P.J., Boyko, W.J., and Edwards, J.R. (1990). The structural analysis of a levan produced by *Streptococcus salivarius* SS2. *Carbohydrate Research* 208 193-198.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Agustín Lopez por la confianza deposita en mí, al permitir unirme a su grupo de trabajo y ser parte fundamental de mí formación.

A la M. C. María Elena Rodriguez por el asesoramiento dedicado durante todo el proyecto, además del apoyo personal brindado en estos dos años.

A los Drs. Clarita Olvera Carranza, Marcela Ayala Aceves y Guillermo Gosset Lagarda por el asesoramemiento brindado durante el transcurso del proyecto.

A los miembros del jurado revisor por sus comentarios y sugerencias:

- Dr. Jose Adelfo Escalante Lozada
- Dra. Marcela Ayala Aceves
- Dra. Gloria Saab Rincon
- Dr. Mariano García Garibay
- Dr. Agustin Lopez Munguia Canales

A Leticia Olvera Rodriguez del laboratorio del Dr. Enrique Morett por la donación de ADN cromosomal de *T. maritima*.

A Aurelia Ocampo Vargas y al T. L. Fernando Gonzalez Muñoz por la asistencia técnica brindada.en el laboratorio.

A Myriam Ortiz García y Mario Alberto Caro Bermudez por la asistencia técnica brindad en la planta piloto.

A mi mamá por su amor y su apoyo incondicional.

A mis hermanos Oscar y Paco por estar siempre conmigo aunque estemos lejos.

A mi abuelita y mi tío chuche por el ejemplo de trabajo y perseverancia, y por mantener sus manos siempre tendidas sobre nosotros.

A mi padre por los días compartidos.

A Mil por su cariño, apoyo y comprensión, especialmente estos últimos meses de trabajo.

A Erandi por la amistad que nació después de tantos años de conocernos.

A Male por el tiempo, esfuerzo, dedicación y amistad brindado.

A mis amigos María y Cuauhtémoc por las palabras de aliento.

A todos los López.

ANEXO

Elsevier Editorial System(tm) for Food Chemistry
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Enzymatic hydrolysis of fructans by two beta-fructosidase preparations

Article Type: Research Article

Keywords: Fructans; Inulin; Levan; Inulinases; Fructozyme L; *T. maritima* BfrA.

Corresponding Author: Dr. Agustín Lopez Munguía,

Corresponding Author's Institution:

First Author: Ivan Muñoz-Gutiérrez

Order of Authors: Ivan Muñoz-Gutiérrez; María Elena Rodríguez Alegría, MSc; Agustín Lopez Munguía

Abstract: It is known that several fructofuranosidases, *exo*-beta-fructosidases in particular may act not only on inulin, but also on levan as well as on other type of fructose polymers such as agavins (from agave plants); in this context, the ability of fructosidases to hydrolyse different type of fructans was compared using two enzyme preparations: a commercial product (Fructozyme L) and an exoinulinase (BfrA) produced from *Thermotoga maritima*.

As expected, both enzymatic products preferentially hydrolyzed beta2-1 linkages and low molecular weight fructans. It is shown that chicory inulin is the fastest degraded substrate with both preparations, followed by bacterial inulin which has a higher molecular weight and branching in beta2-6 position, while all bacterial levans were more slowly hydrolyzed. It was found that Michaelis-Menten kinetics describe the hydrolysis process of sucrose and low molecular weight fructans (≤ 8.3 kDa) with both enzyme preparations, while first order kinetics with respect to fructan concentration was observed for the hydrolysis of high molecular weight inulins and levans (≥ 2200 kDa). From second order rate constant comparison (when including enzyme concentration) it was found that bacterial inulin (*L. citreum* CW28) is hydrolyzed 15 or 9 times more slowly with Fructozyme L and BfrA respectively, relative to chicory inulin. In the case of *L. mesenteroides* NRRL B-512F levan the second order rate constant is 200 or 19 times smaller than chicory inulin with the same two

enzyme preparations. Besides the information provided concerning the kinetic of fructan hydrolysis, these results also suggest that the kinetic behavior may be used to differentiate among fructan structures.

Profesor Fercidoon Shahidi
Food Chemistry
Editor

May 26, 2008

Dear Dr Shahidi:

Please find enclosed the manuscript entitled "Enzymatic hydrolysis of fructans by beta-fructosidase preparations, which we would like to submit for publication in Food Chemistry.

This article deals with the possibility of using inulinases to hydrolyse a wide variety of fructan structures, from inulin to levan including highly branched agavins. The kinetic properties of these hydrolytic processes are defined and compared. Applications include not only the definition of hydrolysis process conditions, but also the possibility to identify changes in fructan structure by changes in kinetic parameters. Two types of fructosidases are used: an integral combination of endo and exo inulinases (Fructozyme L) and a single exo-inulinase produced from a hyper-thermophilic bacteria (*T.maritima*). We found that in both cases, the kinetic behavior is comparable.

Yours sincerely

Agustín LOPEZ MUNGUÍA

1 **Enzymatic hydrolysis of fructans by two β -fructosidase preparations**

2

3 Iván Muñoz-Gutiérrez, María E. Rodríguez-Alegría, Agustín López-Munguía *

4

5 *Instituto de Biotecnología, Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis,*

6 *Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca,*

7

Morelos 62250, México

8 **Abstract**

9

10 It is known that several fructofuranosidases, exo- β -fructosidases in particular may act not
11 only on inulin, but also on levan as well as on other type of fructose polymers such as
12 agavins (from agave plants); in this context, the ability of fructosidases to hydrolyse
13 different type of fructans was compared using two enzyme preparations: a commercial
14 product (Fructozyme L) and an exoinulinase (BfrA) produced from *Thermotoga*
15 *maritima*.

16

17 As expected, both enzymatic products preferentially hydrolyzed β 2-1 linkages and
18 low molecular weight fructans. It is shown that chicory inulin is the fastest degraded
19 substrate with both preparations, followed by bacterial inulin which has a higher
20 molecular weight and branching in β 2-6 position, while all bacterial levans were more
21 slowly hydrolyzed. It was found that Michaelis-Menten kinetics describe the hydrolysis
22 process of sucrose and low molecular weight fructans (\leq 8.3 kDa) with both enzyme
23 preparations, while first order kinetics with respect to fructan concentration was observed
24 for the hydrolysis of high molecular weight inulins and levans (\geq 2200 kDa). From
25 second order rate constant comparison (when including enzyme concentration) it was
26 found that bacterial inulin (*L. citreum* CW28) is hydrolyzed 15 or 9 times more slowly
27 with Fructozyme L and BfrA respectively, relative to chicory inulin. In the case of *L.*
28 *mesenteroides* NRRL B-512F levan the second order rate constant is 200 or 19 times
29 smaller than chicory inulin with the same two enzyme preparations. Besides the

30 information provided concerning the kinetic of fructan hydrolysis, these results also
31 suggest that the kinetic behavior may be used to differentiate among fructan structures.

32

33 **Keywords:** Fructans; Inulinases; Fructozyme L; *T. maritima* exoinulinase (BfrA);
34 Enzymatic hydrolysis.

35

36 **Introduction**

37

38 Fructans are fructose polymers synthesized in nature from sucrose and classified as
39 *inulins*, when bearing mainly β 2-1 glycosidic linkages among fructose molecules or
40 *levans* when fructose molecules are joined by β 2-6 links. Nevertheless, a wide variety of
41 more complex structures derive from the possibility of branching in the complementary
42 position (β 2-6 in the case of inulins and β 2-1 in the case of levans). This is the case of
43 inulin from *Agave tequilana* Weber var. *azul*, the Mexican plant from which Tequila is
44 produced, where the level of branching has led to rename this fructans as *agavins*
45 (Mancilla-Margalli & Lopez, 2006). Several fructan structures are illustrated in Fig.1.

46

47 Fructans are found as reserve carbohydrates in 15% of flowering plants (Hendry,
48 1993), representing after starch, the most common mechanism of energy storage: this is
49 particularly the case of chicory (*Cichorium intybus*) and Jerusalem artichoke (*Heliantus*
50 *tuberosus*) which are now important sources of industrial fructans, while *Agave* and
51 *Dasyliirion* plants fructans (*A. tequilana*, *A. angustifolia*, *A. potatorum*, *A. salmiana*,
52 *Dasyliirion* spp) are the carbon source of important spirituous beverages such as Tequila,

53 Mezcal, Bacanora, and Sotol, originally from Mexico, but now also produced in other
54 countries (Cedeño, 1995; Leon-Rodriguez, Gonzalez-Hernandez, De la Rosa, Escalante-
55 Minakata, & Lopez, 2006; Waleckx, Gschaedler, Colonna-Ceccaldi, & Monsan, 2008).
56 Fructans are also produced by microorganisms, mainly lactic acid bacteria such as
57 *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* and *Weissella*, as well as other species such as
58 *Zymomonas mobilis*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus*
59 *polymyxa* (Korakli & Vogel, 2006).

60

61 In order to hydrolyze fructans to produce fructose or fructooligosaccharides
62 (FOS), fructanhydrolases both of plant or microbial origin may be used. The microbial
63 enzymes are classified according to Avigad & Bauer (1966) as:

64

65 A. Non-specific β -fructofuranosidases, which besides sucrose, can also hydrolyze
66 fructosides from the reducing β 2-1 or β 2-6 end, such as exo- β -fructosidases
67 (exo-inulinases or exolevanases) (EC 3.2.1.80) and 2,6- β -fructan 6-
68 levanbiohydrolases (EC 3.2.1.64)

69 B. Endoinulinases (EC 3.2.1.7) which are specific for internal β 2-1 linkages
70 hydrolysis in inulin.

71 C. Endolevanases (EC 3.2.1.65) which are specific for internal β 2-6 linkages
72 hydrolysis in levan.

73

74 Only exo- β -fructosidases have been identified in plants; they have been classified
75 as (a) fructan β -(2-1)-fructosidases (EC 3.2.1.153) and (b) fructan β -(2-6)-fructosidases

76 (EC 3.2.1.154), due to their high specificity for each particular type of linkage and their
77 low or nil invertase activity (Van den Ende, Yoshida, Clerens, Vergauwen, & Kawakami,
78 2005; Verhaest, Van den Ende, Le Roy, De Ranter, Van Laere, & Rabijns, 2005). It is
79 important here to observe that exoinulinases can act on both type of linkages and
80 therefore are able to hydrolyze inulin as well as levan. As already mentioned, in some
81 cases the percentage of both type of linkages is such that it is difficult to define fructans
82 clearly as inulins or levans, so from the specificity and kinetic point of view, it is
83 interesting to observe how inulinases behave in this wide range of substrate structures.
84 Furthermore, many microorganisms present in some fermentation systems such as
85 sourdough (Tieking, Korakli, Ehrmann, Ganzle, & Vogel, 2003), pozol (Olivares-Illana,
86 Wachter-Rodarte, Le Borgne, & Lopez-Munguia, 2002) or pulque (Escalante, Giles-
87 Gómez, Hernández, Córdova-Aguilar, López-Munguía, Gosset, & Bolívar, 2008), are
88 able to produce inulin or levan from different enzymatic pathways; this is also the case of
89 the mouth microbiota where *S. mutans* (inulin producer) and *S. salivarius* (levan
90 producer) coexist (Ebisu, Kato, Kotani, & Misaki, 1975). It is therefore interesting to
91 know if all type of fructans are subjected to fructosidase hydrolysis and the
92 corresponding rates.

93

94 In the last decade, interest for inulin as well as for its fructooligosaccharides has
95 dramatically increased due to their outstanding nutraceutical and organoleptic properties
96 (Niness, 1999) while antitumoral and cosmetic properties have also been reported for
97 levans (Calazans, Lima, de Franca, & Lopes, 2000; Kim, Chung, Kim, Kim, Han, & Kim,
98 2005; Yoon, Yoo, Cha, & Lee, 2004). Similar to starch, inulin is therefore becoming an

99 important agroindustrial raw material that may be transformed through enzymatic
100 processes in higher added value products (Gill, Manhas, & Singh, 2006; Jin, Wang,
101 Jiang, & Xu, 2005). For this purpose, several enzymes have been reported and widely
102 studied, particularly those from *Aspergillus* spp. (Singh & Gill, 2006), and some
103 commercial products combining both endo and exoinulinase activities are available, such
104 as Fructozyme L (Novozymes). In a different context, Megazyme International Ireland
105 Ltd. has developed an enzymatic kit based on fructanhydrolases from *A. niger* in order to
106 quantify fructans based on the measurement of the resulting fructose. In both systems,
107 working temperatures of around 50 °C are reported. Although these enzymatic products
108 are rather stable, thermostable inulinases are an interesting option for this developing
109 industry as they allow for higher processing temperatures which may result convenient
110 due to the higher solubility of substrates and products, higher reaction rates, and less risks
111 of microbial contamination. In this context, BfrA, an exoinulinase from *Termotoga*
112 *maritima* is one of the most stable β -fructosidases reported so far (Liebl, Brem, &
113 Gotschlich, 1998).

114

115 Considering the increasing role of fructans and fructan hydrolysis in industry, it is
116 important to explore their kinetic behavior when subjected to enzymatic hydrolysis by β -
117 fructosidases. This is important not only for reaction designing purposes but also as a tool
118 for fructan characterization based on their susceptibility to fructanhydrolases, for instance
119 to establish changes in fructan structure derived from mutations in the synthesizing
120 enzymes. Therefore, the purpose of this research is to observe the kinetic behavior of
121 fructans of microbial and plant origin, when subjected to hydrolysis by a commercial

122 inulinase product (Fructozyme L) and the thermostable exoinulinase BfrA from *T.*
123 *maritima*.

124

125 **Materials & Methods**

126

127 *Fructans*

128 Several fructans were selected for this study: Raftiline HP, a vegetal inulin from chicory
129 plants (Orafti, Belgium), vegetal inulin (agavin) extracted from *A. tequilana* Weber var.
130 *azul*, microbial inulin from *Leuconostoc citreum* CW28 produced as described by Ortiz-
131 Soto et al. (2004), microbial levan from *Bacillus subtilis* produced as described by Ortiz-
132 Soto et al. (2008), levan from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F produced as
133 described by Morales-Arrieta et al. (2006) and levan from *L. mesenteroides* ATCC 8293
134 produced as described by Olvera et al. (2007). Microbial fructans were recovered from
135 the corresponding cultures by precipitation with ethanol, washed by repeated cycles of
136 precipitation, and freeze dried. Inulin from agave was extracted using 3 parts of water per
137 part of mashed agave pines at 60 °C, centrifuged and freeze dried. Fructan molecular
138 weights are reported in Table II of the Results and Discussion section.

139

140

141

142 *Enzyme preparations*

143 Fructozyme L, a commercial enzymatic product obtained from *A. niger* combining endo
144 and exoinulinase activities was kindly provided by Novozymes, Mexico. Exoinulinase

145 from *T. maritima* (BfrA) was selected for comparison as it is a single enzyme bearing
146 activity towards β 2-1 and β 2-6 linkages. The inulinase gene *bfrA* which codes for a β -
147 fructosidase (Liebl, Brem, & Gotschlich, 1998) was amplified using the enzyme "Expand
148 High Fidelity PCR System" (Roche, Mannheim, Germany) from a *T. maritima* genome
149 bank kindly provided by Professor E. Morett from the Instituto de Biotecnología of
150 UNAM (Cuernavaca, México), in an PCR equipment "RoboCycler Gradient 96"
151 (Stratagene, La Jolla, CA), using two oligonucleotides:

152

153 *Sac* I

154 Direct: CCG GAG CTC GAT GTT CAA GCC GAA TTA TCA C

155

Hind III

156 Reverse: GCG CTG CGA AGC TTC CAT ATG TTC TCG AGT TCA A

157

158 The amplified product was cloned in the expression vector pET-22b (+)
159 (Novagen, San Diego, CA) employing the restriction enzymes *Hind* III and *Sac* I using
160 the Quick ligation TM Kit (New England BioLabs). Electro competent *Escherichia coli*
161 DH5 α cells were transformed with this vector which was finally sequenced to verify the
162 construction. After growth and induction, cells were harvested by centrifugation at 4°C
163 during 10 min and 10 000 rpm, and the pellet treated in a French press. The *E. coli*
164 extract was heat treated 1 hr at 70 °C to eliminate the thermostable proteins and used as
165 the source of the enzyme after demonstrating by a zymogram that BfrA was the only
166 protein active towards fructans.

167

168 *Zymogram*

169 Sodium dodecyl sulphate / polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) were
170 prepared at 10% as described by Laemmli (1970) mixed with inulin or levan to a final
171 concentration of 20 mg/mL. After protein separation, the gels were washed three times
172 with a 50 mM acetate buffer, pH 4.5 in the case of Fructozyme L or 5.5 in the case of
173 BfrA and 1% of Tween 80 for protein renaturalization. *In situ* hydrolysis was then
174 induced incubating the gels with buffer overnight. The use mercaptoethanol was avoided
175 during SDS-PAGE as the structure of the inulinases present in Fructozyme L is unknown.

176

177 In order to observe the enzymatic activity directly on the gel the rails containing
178 the molecular weight marker were stained with Coomassie Brilliant Blue, while those
179 containing Fructozyme L or BfrA were stained with the Schiff reagent (Sigma, St. Louis,
180 Missouri) using the following procedure: first, the gels were incubated during 30 minutes
181 in a 75% ethanol solution, followed by one hour incubation in a solution of periodic
182 (0.7%) and acetic acids (5%). After three 20min washing steps with a sodium bisulfite
183 (0.2 %) acetic acid (5%) solution, the gels were finally placed in contact with the Schiff
184 reagent, staining the whole gels except the regions where β -fructosidase degraded the
185 fructan polymer.

186

187

188 *Enzymatic reaction and activity*

189 Reactions with Fructozyme L were performed at 60 °C in pH 4.5, 50 mM acetate buffer;
190 for BfrA, reactions were performed at 75 °C in a pH 5.5, 50 mM acetate buffer. All
191 reactions were carried out in duplicates.

192

193 Reaction were monitored by following the release of reducing power using the 3,5
194 dinitrosalicylic acid (DNS) method, as reported by Miller (1959). One unit of enzyme
195 activity was defined as the amount of enzyme liberating 1 μmol of fructose equivalents
196 per minute. To standardize the commercial product vis-a-vis the recombinant enzyme, the
197 enzymatic activity of both preparations was measured using 439 mM sucrose as
198 substrate. Under these conditions Fructozyme L contains 25,323 U/mL, while the
199 partially purified *E. coli* extract contained 165 U/ml.

200

201 Hydrolysis at 50 g/L of fructan was carried out during 24 and 48 hours using 15
202 U/mL of Fructozyme L or BfrA. In order to obtain the level hydrolysis and to analyze the
203 end products of reaction, hydrolysis products were measured both by the DNS method, as
204 well as by HPLC (HPLC equipment and columns were from Waters Corporation,
205 Milford, Massachusetts). Fructose was measured in a Carbohydrate High Performance
206 Column (4.6 x 250 mm cartridge), using 1.4 mL/min of a 75:25 acetonitrile:water
207 mixture at 35 °C. Products were also analyzed by their molecular weight distribution
208 using a two columns chromatographic system connected in series: Ultrahydrogel Linear
209 Column (7.8 x 300 mm) and Ultrahydrogel 500 Column (7.8 x 300 mm), resulting in a
210 fractionation range of 500 and 10×10^6 Da. Sodium nitrate 0.1 M was used as eluant at a
211 0.8 mL/min rate at 35 °C. A molccular weight standard was constructed using dextrans of

212 known molecular weight in the 5.2 to 668 kDa range, and the molecular weight average
213 was calculated for bacterial fructans.

214

215 Agavin was hydrolyzed using H₂SO₄ (0.05 N) at 120 °C during 1 hour, and
216 Fructose and Glucose were measured by HPLC as described above. The degree of
217 polymerization was obtained by the ratio Fructose/Glucose, assuming that for each
218 Fructan molecule exist one Glucose. Finally, oligosaccharides were measured in a C18
219 column (Waters Spherisorb ODS2 Column, 4.6 x 250 mm) using 0.7 mL/min of water as
220 the mobil phase at room temperature. In all cases a Waters 410 Differential
221 Refractometer was used as detector.

222

223 *Kintec analysis*

224 Considering that, in the case of the commercial product, we are dealing with a mixture of
225 activities, the kinetic analysis and kinetic data generated, give an idea of the reaction
226 behavior and the magnitude of the reaction rates, but can only be used for comparative
227 purposes, as will be discussed later. In those cases in which initial fructan hydrolysis rates
228 as a function of substrate concentration could be described by simple Michaelis-Menten
229 type kinetics, including sucrose hydrolysis, V_{max} and K_m were determined from linear
230 regression analysis of the experimental data. First and second order rate constants were
231 also determined, considering that:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

232

233 In the case of low substrate concentration ($Km \gg S$):

234

$$v = \frac{V_{\max}}{Km} [S] = k' [S] = k'' [E] [S] \quad (2)$$

235

236 Where: $k' = \frac{V_{\max}}{Km}$ is the first order rate constant and $k'' = \frac{k_{cat}}{Km}$ the second order

237

238 rate constant of the Michaelis Menten, with also: $k' = k'' [E]$.

239

240 However, in most cases, particularly those involving bacterial fructans, first order

241 kinetics were observed in a wide range of substrate concentration at a given enzyme

242 activity. In those cases, fructan hydrolysis was described by a pseudo first order model:

243

$$v = -\frac{dF}{dt} = k' F \quad (3)$$

244

245 or the integrated equation:

246

$$\ln \frac{F_0}{F} = k' t \quad (4)$$

247

248 Where F is the molar fructose concentration in the polymer and k' de pseudo

249 first order rate constant. As the rate is also dependent on enzyme concentration, we can

250 also describe these reactions by a second order rate constant (k'') as:

251

$$v = -\frac{dF}{dt} = k''[E]F \quad (5)$$

252

253 In order to describe the reactions in terms of fructose production or fructose
254 equivalents, polymer concentration was defined in terms of F , the total molar fructose
255 concentration. In these conditions the initial concentration F_o is defined as:

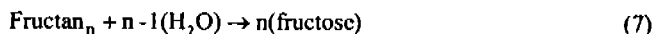
256

$$F_o = \frac{F_o'}{180r} \quad (6)$$

257

258 Where F_o' is the initial mass fructose concentration, 180 is the fructose molecular
259 weight and " r " is a correction factor to account for the water molecules involved in the
260 transformation of fructose to fructan considering that:

261



262

263 So that:

264

$$r = \frac{\text{Fructan}_n}{n(\text{fructose})} \quad (8)$$

265

266 Where " n " represents the polymerization degree of the polymer. It is clear that r
267 approaches 0.9 for " n " values larger than 10, so that a constant transformation factor can

268 be applied for this calculation without introducing an important error. Polymerization
269 degrees of plant fructan used were higher than 30, while bacterial fructan reached values
270 greater than 10 000.

271

272 The evolution of F with time was therefore estimated from the difference
273 between F_0 and the fructose concentration value determined by DNS method. This is an
274 approximation based on the assumption that all reducing fructans products can be
275 represented by a fructose equivalent concentration. Fructose equivalents will approach
276 real fructose concentration at high fructan conversion or in the case of exoinulinase
277 which directly releases fructose from fructan.

278

279 **Results and Discussion**

280

281 *Zymograms*

282 Fructozyme L has at least three enzymes acting on chicory inulin as can be observed
283 between 40 and 60 kDa in the zymogram shown in figure 2A, while in the case of *L.*
284 *mesenteroides* NRRL B-512F levan, only one activity is observed between 50 and 60
285 kDa in the levan zymogram (figure 2B), that may correspond to an exoinulinase, as these
286 type of inulinases can hydrolyze both inulin and levan. Therefore this experiment
287 demonstrates that Fructozyme L is composed by a mixture of endo and exoinulinases. A
288 single activity band corresponding to a molecular weight of 50 kDa was observed in
289 inulin and levan zymograms when reacted with BfrA, as already reported by Liebl et al.
290 (1998) (results not shown).

291

292 *Fructan hydrolysis by Fructozyme L*

293 As shown in Figure 3A, only sucrose and plant fructans follow a Michaelis-Menten type
294 kinetic behavior when the initial reaction rates are measured at different substrate
295 concentrations. However, in the case of the plant polymers, the limits of solubility were
296 reached before a maximum reaction rate (saturation) was observed. The calculated
297 parameters for chicory inulin and agavin are given in Table I, where the estimated
298 maximum initial reaction rate (V_{max}) is given per volume of *T. maritima* culture extract
299 or Fructozyme L. In Figure 3B it may also be observed that bacterial fructans are
300 hydrolyzed following a first order kinetic behavior, in the same concentration range and
301 explored up to their solubility limits.

302

303 As expected, Fructozyme L preferentially hydrolyze polymers with β 2-1 linkages
304 of relatively low molecular weight, as evident from the rate data in figure 3 and the
305 parameters reported in Table I, with the highest rates observed for the hydrolysis of
306 chicory inulin. As also shown in Table I, sucrose and vegetal fructans have almost the
307 same V_{max} values; however, when K_m values are compared, it was found that chicory
308 inulin was hydrolyzed with the highest affinity. Among plant fructans, a higher affinity
309 was observed for chicory inulin (8.3 kDa) than for agavin (6.2 kDa), with an almost 4-
310 fold smaller K_m , due to the complex structure of agavins containing a higher β 2-6
311 branching level. It should be noted that kinetic parameters obtained with vegetal fructans
312 are hypothetical, since we are dealing with several enzymes and extrapolating the
313 saturation values.

314

315 Bacterial fructan hydrolysis data was analyzed with a first order reaction model as
316 reported in Figure 4, and from this data, the reaction rate constants were determined
317 according to equation 4. These results are summarized in Table II where it may be
318 observed that a wide degree of specificity in the hydrolysis of fructans exists depending
319 on the substrate structure and molecular weight: plant fructans usually range in the 30-60
320 polymerization degree (PD), rarely exceeding 200, while bacterial fructans may have PD
321 higher than 100 000 (Vijn & Smeekens, 1999).

322

323 Experiments at known enzyme and substrate concentration allowed the
324 calculation of second order rate constants k'' which are also reported in Table II, relative
325 to the value obtained for chicory inulin. This allows a comparative analysis of all fructans
326 independently of their kinetic behaviour (whether first order or Michaelis-Menten in the
327 first order region). From these values it is evident that plant fructans (A & B) are more
328 rapidly hydrolyzed than bacterial fructans (C-F), and may be concluded that chicory
329 inulin is hydrolyzed at the highest rate, with a k'' three times higher than that of agavin.
330 Among bacterial fructans, *L. citreum* inulin (C), was hydrolyzed more rapidly than all
331 levans, however with a k'' of only 6.5% of that of chicory.

332

333 Levan structure, as proposed by Tanaka et al (1980) for levan from *B. subtilis* is
334 shown in Figure 1; similar structures have been proposed for other bacterial fructans of
335 different size and level of branching (Ebisu, Kato, Kotani, & Misaki, 1975; Feingold &
336 Gehatia, 1957; Simms, Boyko, & Edwards, 1990). In this context, *B. subtilis* levan has a

337 bimodal distribution of fructans with 8.3 and 3500 kDa of average molecular weight; the
338 presence of the low molecular weight fraction may explain the highest k'' obtained for
339 this levan when compared to the two *L. mesenteroides* strains levan (E&F), which have
340 an average molecular weight higher than 2000 kDa. However, *L. citreum* inulin (C) is
341 hydrolyzed faster than *B. subtilis* levan, even though it has a three orders of magnitude
342 higher molecular weight, due to the higher affinity of the enzyme complex for β 2-1
343 linkages. In this enzymatic complex, only the exoinulinases are active towards levans,
344 while inulins, including *L. citreum* inulin, are hydrolyzed by both endo and exo
345 fructanhydrolases.. The rather similar behavior observed for levans of two different *L.*
346 *mesenteroides* strains (E&F), suggests they have similar structures.

347

348 After 24 hours of reaction, it was observed that plant and *L. citreum* inulins are
349 highly hydrolyzed, with chicory inulin reaching the highest hydrolysis conversion (Table
350 II). Again, the high level of branching in agavins may explain the lower conversions
351 reached after 24 hours, as compared to chicory inulin. It has been reported that the ratio
352 of β 2-1/ β 2-6 linkages in agavins varies between 1.6 and 2.7 depending on the production
353 region (Mancilla-Margalli & Lopez, 2006); on the other hand *L. citreum* inulin although
354 very much larger (3000 kDa) than agavin (6.2 kDa) is hydrolyzed to the same extent due
355 to its rather linear β 2-1 structure, as it was found from a methylation analysis carried out
356 by Orafiti Group (Belgium) that it only contains 1.8% of β 2-6 linkages (results not
357 shown).

358

359 The lower conversion observed for levans when are compared with inulins and
360 agavin are consistent with their structure, although higher conversions (around 50%)
361 certainly result from a higher β 2-1/ β 2-6 linkages ratio. Changes in structure therefore
362 result in changes both, in initial reaction rate parameters as well in substrate conversion.

363

364 The hydrolysis products were followed after 24 and 48 h of reaction by HPLC in
365 order to analyze the residual polymer molecular weight distribution as a function of time.
366 These results are shown in Figure 5 for chicory inulin and *B. subtilis* levan, where it may
367 be observed that for chicory inulin the polymer is degraded completely, while in the case
368 of *B. subtilis* levan, the hydrolysis is slower and the changes in the polymer molecular
369 weight distribution are observable, and as discussed earlier, the low molecular weight
370 polymers are first degraded. Agavin and inulin from *L. mesenteroides* and chicory are
371 degraded up to fructose, and levans from the two levan producing *L. mesenteroides*
372 strains followed the same behavior as *B. subtilis* levan, being *L. mesenteroides* NRRL
373 B512F levan the most recalcitrant (results not shown).

374

375 When the hydrolysis products were analyzed in a C18 column to follow the
376 synthesis of oligosaccharides (Figure 6), it was found that, at all times, the combined
377 action of exo and endoinulinases on *L. citreum* inulin, hydrolyzed fructants to fructose
378 without the accumulation of measurable amounts of oligosaccharides. In the case of *L.*
379 *mesenteroides* NRRL B512-F levan, because only exoinulinases can act on the polymer,
380 fructose is the only product. The same behavior was observed for other fructans being
381 fructose the only product present during the reaction (data not shown).

382

383 *Fructan hydrolysis by BfrA*

384 In order to further explore and validate these results, the same type of experiments were
385 performed with BfrA and three representative fructans from the previous experiments:
386 chicory inulin, *L. citreum* CW28 inulin and *L. mesenteroides* NRRL B512-F levan. BfrA
387 liberates fructose residues from the non reducing end of both type of fructans. As shown
388 in Figures 7 and 8, the overall kinetic behavior and specificity already reported for
389 Fructozyme L was observed also with BfrA, following a Michaelis-Menten kinetic
390 behavior for sucrose and chicory inulin, and a pseudo first order kinetic behavior for
391 bacterial fructan. The kinetic parameters calculated for sucrose and chicory inulin are
392 also shown in Table I, demonstrating that BfrA has the highest activity toward sucrose
393 with a V_{max} two times higher than for chicory inulin; however, BfrA shows a highest
394 affinity for chicory inulin with a K_m two times smaller than that of sucrose. This is not
395 surprising since BfrA has been defined both as invertase and inulinase, so that K_m
396 parameters obtained during our experiments are congruent with the data reported by Liebl
397 et al. (1998) for sucrose and inulin. BfrA hydrolyses *L. citreum* inulin (H) at
398 approximately $1/10^{\text{th}}$ of the chicory inulin hydrolysis rate and *L. mesenteroides* levan (I)
399 at $1/20^{\text{th}}$ as deduced from the rate constants reported in Table II.

400

401 As results given in figures 3 and 7 are reported in terms of mL of Fructozyme L or
402 recombinant enzyme extract, the rate values among the two enzymatic preparations are
403 not directly comparable: in terms of sucrose enzyme activity units, 1 mL of Fructozyme
404 L is equivalent to 153.5 mL of the recombinant inulinase. As shown in Table II enzyme

405 concentration based on sucrose activity units was almost the same for chicory inulin
406 hydrolysis. In this conditions, the pseudo first order constants is reduced from 25.6 with
407 fructozyme to 3.3 min⁻¹ with BfrA for the hydrolysis of chicory inulin, that is to say, for
408 this substrate, the enzyme complex “Fructozyme” is 7 times more efficient than the single
409 exoinulinase from *T. maritima*.

410

411 When reactions were explored in the long term a more important difference was
412 observed among fructans as reported in Table II. The lower conversions reached by the
413 BfrA may in general be explained by the lower efficiency of the single exoinulinase as
414 compared to the combined action of an exo and endo inulinases in Fructozyme L; they
415 are also the consequence of the higher specificity towards β 2-1 linkages of the enzyme as
416 levans are not completely hydrolyzed in the defined reaction time.

417

418 **Conclusions**

419 Fructans in nature have a wide variety of structures: some of them are radical, as the
420 categoric difference between linear inulins and linear levans, but some other ones are less
421 obvious: the difference between a highly branched inulin and a highly branched levan.
422 Inulinases are becoming very important for the hydrolysis processes of inulins in
423 industry. However, as these enzymes can also act on branched inulins and levans, the
424 kinetic behavior may be used, not only to characterize the hydrolytic process itself, but
425 also to differentiate among fructan structures. This has been demonstrated in this study,
426 as both kinetic behavior and parameters have been shown dependent on fructan structure.
427 Therefore, a preliminary idea on the structure of a given fructan may be obtained by its

428 kinetic behavior when compared with fructans of known structure. Furthermore, changes
429 on polymer structure resulting from mutations in the synthesizing enzymes (eg
430 levansucrase or inulosucrase) may be detected by changes in the kinetic behaviour,
431 before proceeding to more expensive and cumbersome techniques. This may become a
432 valuable tool in site directed mutagenesis studies of fructosyltransferases.

433

434 **Acknowledgments:** This project was financed by PAPIIT no. IN228006-3 and FOMIX-
435 CONACYT no. 80360. We thank Leticia Olvera-Rodríguez and Fernando González-
436 Muñoz for technical assistance in laboratory, Myriam Ortiz-García and Mario A. Caro-
437 Bermudez for pilot plant experiments, and Leen de Leenhcer from Orafiti Company for *L.*
438 *citreum* CW28 and *L. mesenteroides* NRRL B-512F fructan structure analysis.

439 **References**

- 440 Avigad, G and Bauer, S. (1966). Fructan Hydrolases. *Methods in Enzymology*, 8, 621-
441 628.
- 442 Calazans, G. M. T., Lima, R. C., de Franca, F. P., and Lopes, C. E. (2000). Molecular
443 weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. *International Journal*
444 *of Biological Macromolecules*, 27, 245-247.
- 445 Cedeño, M. (1995). Tequila Production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 15, 1-11.
- 446 Ebisu, S., Kato, K., Kotani, S., and Misaki, A. (1975). Structural Differences in Fructan
447 Elaborated by *Streptococcus mutans* and *Strep. salivarius*. *Journal of Biochemistry*,
448 78, 879-887.
- 449 Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernández, G., Córdova-Aguilar, M. S., López-
450 Munguía, A., Gosset, G., and Bolívar, F (2008). Analysis of bacterial community
451 during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a
452 polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology, In Press*,
- 453 Feingold, D. S. and Gehatia, M. (1957). The structure and Properties of Levan, a Polymer
454 of D-Fructose Produced by Cultures and Cell-Free Extracts of *Aerobacter levanicum*.
455 *Journal of Polymer Science*, 13, 783-790.

- 456 Gill, P. K., Manhas, R. K., and Singh, P. (2006). Purification and properties of a heat-
457 stable exoinulinase isoform from *Aspergillus fumigatus*. *Bioresource Technology*, *97*,
458 894-902.
- 459 Hendry, J. A. F. (1993). Evolutionary origins and natural functions of fructans - a
460 climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytologist*, *123*, 3-14.
- 461 Jin, Z. Y., Wang, J., Jiang, B., and Xu, X. M. (2005). Production of inulooligosaccharides
462 by endoinulinases from *Aspergillus ficuum*. *Food Research International*, *38*, 301-
463 308.
- 464 Kim, K. H., Chung, C. B., Kim, Y. H., Kim, K. S., Han, C. S., and Kim, C. H. (2005).
465 Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *Journal of*
466 *Cosmetic Science*, *56*, 395-406.
- 467 Korakli, M. and Vogel, R. F. (2006). Structure/function relationship of
468 homopolysaccharide producing glycanases and therapeutic potential of their
469 synthesised glycans. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *71*, 790-803.
- 470 Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head
471 of Bacteriophage T4. *Nature*, *227*, 680-685.
- 472 Leon-Rodriguez, A., Gonzalez-Hernandez, L., De la Rosa, A. P. B., Escalante-Minakata,
473 P., and Lopez, M. G. (2006). Characterization of volatile compounds of mezcal, an

- 474 ethnic alcoholic beverage obtained from *Agave salmiana*. *Journal of Agricultural and*
475 *Food Chemistry*, 54, 1337-1341.
- 476 Liebl, W., Brem, D., and Gotschlich, A. (1998). Analysis of the gene for beta-
477 fructosidase (invertase, inulinase) of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga*
478 *maritima*, and characterisation of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Applied*
479 *Microbiology and Biotechnology*, 50, 55-64.
- 480 Mancilla-Margalli, N. A. and Lopez, M. G. (2006). Water-soluble carbohydrates and
481 fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyliirion* species. *Journal of Agricultural*
482 *and Food Chemistry*, 54, 7832-7839.
- 483 Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing
484 Sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- 485 Morales-Arrieta, S., Rodriguez, M. E., Segovia, L., Lopez-Munguia, A. G., and Olvera-
486 Carranza, C. (2006). Identification and functional characterization of *levS*, a gene
487 encoding for a levansucrase from *Leuconostoc mcsenteroides* NRRL B-512F. *Gene*,
488 376, 59-67.
- 489 Niness, K. R. (1999). Inulin and oligofructose: What are they? *Journal of Nutrition*, 129,
490 1402S-1406S.

- 491 Olivares-Illana, V., Wacher-Rodarte, C., Le Borgne, S., and Lopez-Munguia, A. (2002).
492 Characterization of a cell-associated inulosucrase from a novel source: A *Leuconostoc*
493 *citreum* strain isolated from Pozol, a fermented corn beverage of Mayan origin.
494 *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28, 112-117.
- 495 Olvera, C., Centeno-Leija, S., and Lopez-Munguia, A. (2007). Structural and functional
496 features of fructansucrases present in *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293.
497 *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular*
498 *Microbiology*, 92, 11-20.
- 499 Ortiz-Soto, M. E., Olivares-Illana, V., and Lopez-Munguia, A. (2004). Biochemical
500 properties of inulosucrase from *Leuconostoc citreum* CW28 used for inulin synthesis.
501 *Biocatalysis and Biotransformation*, 22, 275-281.
- 502 Ortiz-Soto, M. E., Rivera, M., Rudiño-Piñero, E., Olvera, C., and López-Munguía, A.
503 (2008). Selected Mutations in *Bacillus subtilis* Levansucrase Semiconserved Regions
504 Affecting Its Biochemical Properties. *Protein Engineering Design and Selection*, In
505 *Press*,
- 506 Simms, P. J., Boyko, W. J., and Edwards, J. R. (1990). The structural analysis of a levan
507 produced by *Streptococcus salivarius* SS2. *Carbohydrate Research*, 208, 193-198.
- 508 Singh, P. and Gill, P. K. (2006). Production of inulinases: Recent advances. *Food*
509 *Technology and Biotechnology*, 44, 151-162.

- 510 Tanaka, T, Oi, S, and Yamamoto, T (1980). The Molecular Structure of Low and High
511 Molecular Weight Levans Synthesized by Levansucrase. *Journal of Biochemistry*, 87,
512 297-303.
- 513 Ticking, M., Korakli, M., Ehrmann, M. A., Ganzle, M. G., and Vogel, R. F. (2003). In
514 situ production of exopolysaccharides during sourdough fermentation by cereal and
515 intestinal isolates of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 69,
516 945-952.
- 517 Van den Ende, W., Yoshida, M., Clerens, S., Vergauwen, R., and Kawakami, A. (2005).
518 Cloning, characterization and functional analysis of novel 6-kestose exohydrolases (6-
519 KEHs) from wheat (*Triticum aestivum*). *New Phytologist*, 166, 917-932.
- 520 Verhaest, M., Van den Ende, W., Le Roy, K., De Ranter, C. J., Van Laere, A., and
521 Rabijns, A. (2005). X-ray diffraction structure of a plant glycosyl hydrolase family 32
522 protein: fructan 1-exohydrolase IIa of *Cichorium intybus*. *Plant Journal*, 41, 400-411.
- 523 Vijn, I. and Smeekens, S. (1999). Fructan: More than a reserve carbohydrate? *Plant*
524 *Physiology*, 120, 351-359.
- 525 Waleckx, E., Gschaedler, A., Colonna-Ceccaldi, B., and Monsan, P. (2008). Hydrolysis
526 of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul during the cooking step in a
527 traditional tequila elaboration process. *Food Chemistry*, 108, 40-48.

528 Yoon, E. J., Yoo, S. H., Cha, J. H., and Lee, H. G. (2004). Effect of levan's branching
529 structure on antitumor activity. *International Journal of Biological Macromolecules*,
530 34, 191-194.
531

532 **Table and Figure Legends**

533

534 **Table I.** Michaelis Menten kinetic parameters calculated for the sucrose and two plant
535 fructans hydrolysis with Fructozyme L and an exo-fructohydrolase from *T.maritima*
536 (BfrA) .

537 **Table II.** Molecular weight, kinetic properties (reaction model, pseudo first and second
538 order rate constants) and conversion after 24h of reaction for fructans hydrolyzed with
539 Fructozyme L and an exo-fructohydrolase from *T.maritima* (BfrA).

540

541

542 **Figure 1.** Fructan structures. A) inulin, B) levan, C) and D) *A. tequilana* Weber var. *Azul*
543 fructan structures proposed by Mancilla-Margalli and López (2006) for plants grown in
544 Los Altos, Jalisco, Mexico, and E) low weight *B. subtilis* levan structure as proposed by
545 Tanaka et al. (1980).

546

547 **Figure 2.** Fructozyme L zymograms carried out with A) chicory inulin and B) *L.*
548 *mesenteroides* NRRL B-512F levan. In both gels: line 1, molecular mass marker; lines 2
549 and 3, Fructozyme L activity.

550

551 **Figure 3.** Fructans and sucrose hydrolysis kinetics with Fructozyme L at pH 4.5 and 60
552 °C. Continued lines represent the adjustment with the Michaelis-Menten model for
553 sucrose and vegetal fructans, and with a first order model for bacterial fructans. All rates
554 are defined by mL of Fructozyme L bearing 25 323 U/mL.

555

556 Figure 4. First order models describing bacterial fructans hydrolysis with Fructozyme L
557 at different substrate concentration (pH 4.5, 60 °C). Continuous lines represent the first
558 rate adjustment.

559

560 Figure 5. Molecular weight distribution of final hydrolysis products obtained with
561 Fructozyme L from: A) chicory inulin and B) *B. subtilis* levan. Black lines represent the
562 initial product, green lines products after 24 hours of reaction, and red lines after 48 hours
563 of reaction.

564

565 Figure 6. A) *L. citreum* CW28 inulin and B) *L. mesenteroides* NRRL B-512F levan
566 evolution during hydrolysis. No oligosaccharide formation is observed.

567

568 Figure 7. Fructans and sucrose hydrolysis kinetics with BfrA at pH 5.5 and 75 °C.
569 Continued lines represent the adjustment with the Michaelis-Menten model for sucrose
570 and chicory inulin and with a first order model for bacterial fructans. All rates are defined
571 by mL of BfrA bearing 165 U/mL.

572

573 Figure 8. First order models describing bacterial fructan hydrolysis with BfrA at different
574 substrate concentration (pH 5.5, 75 °C). Continuous lines represent the first rate
575 adjustment.

576

577

Figure 1

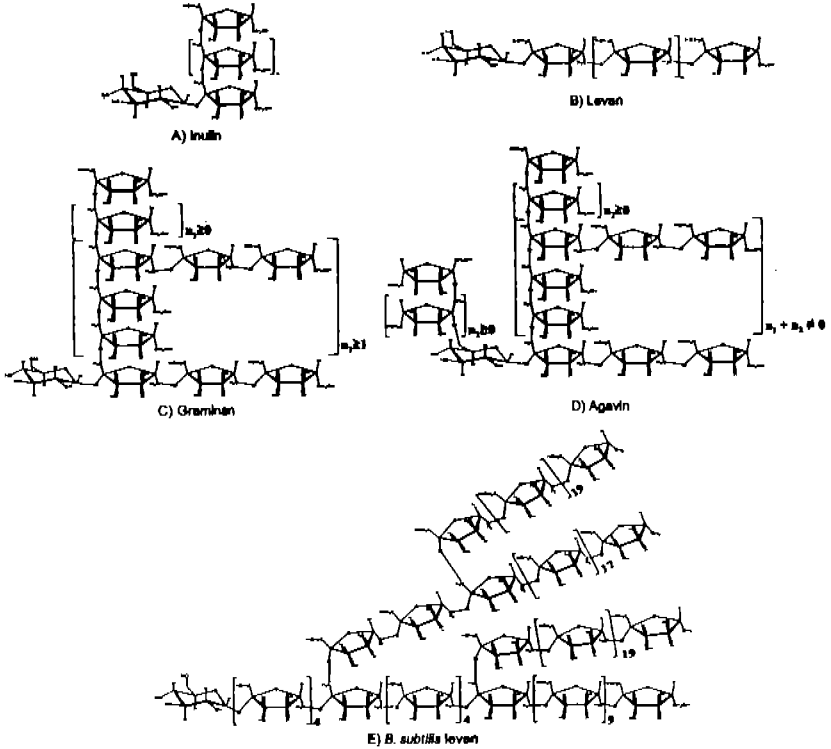


Figure 1. Fructan structures. A) inulin, B) levan, C) and D) *A. tequilana* Weber var. *Azul* fructan structures proposed by Mancilla-Margalli and López (2006) for plants grown in Los Altos, Jalisco, Mexico, and E) low weight *B. subtilis* levan structure as proposed by Tanaka et al. (1980).

Figure 2

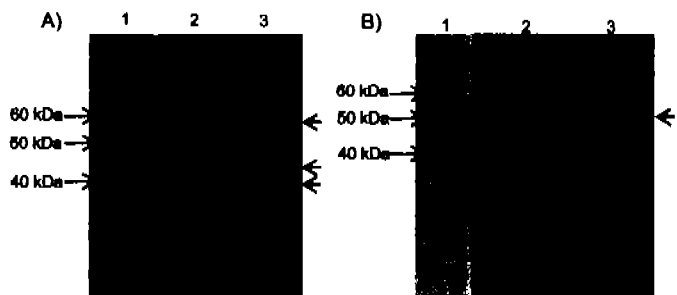


Figure 2. Fructozyme L zymograms carried out with A) chickory inulin and B) *L. mesenteroides* NRRL B-512F levan. In both gels: line 1, molecular mass marker; lines 2 and 3, Fructozyme L activity.

Figure 3

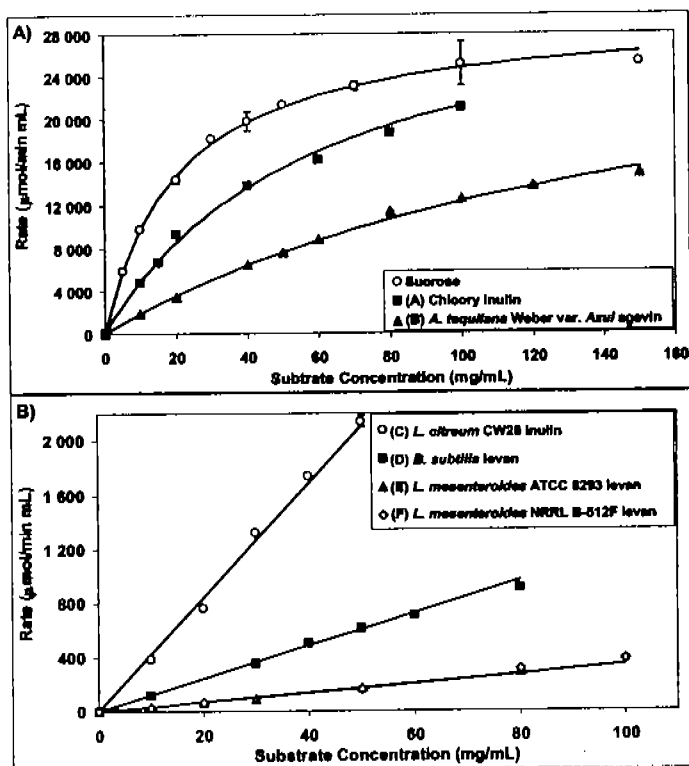


Figure 3. Fructans and sucrose hydrolysis kinetics with Fructozyme L at pH 4.5 and 60 °C. Continued lines represent the adjustment with the Michaelis-Menten model for sucrose and vegetal fructans, and with a first order model for bacterial fructans. All rates are defined by mL of Fructozyme L bearing 25 323 U/mL.

Figure 4

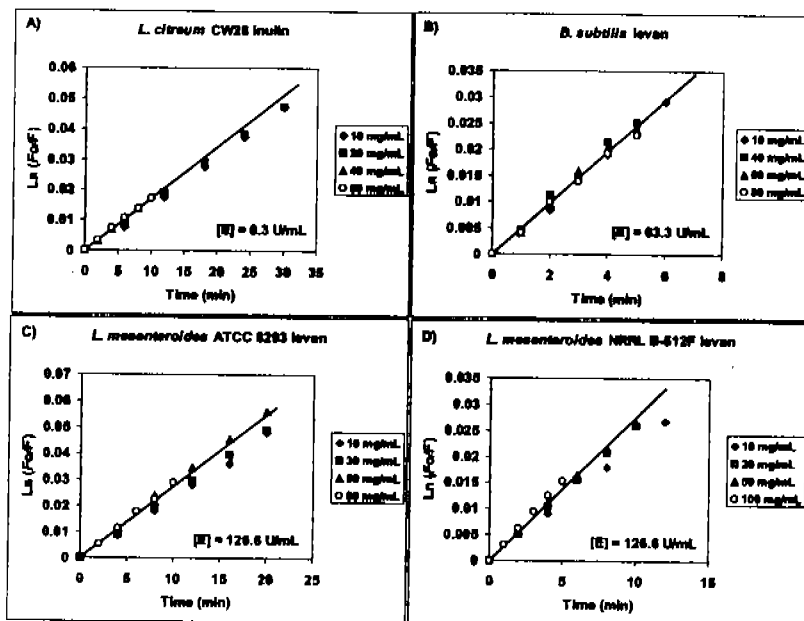


Figure 4. First order models describing bacterial fructans hydrolysis with Fructozyme L at different substrate concentration (pH 4.5, 60 °C). Continuous lines represent the first rate adjustment.

Figure 5

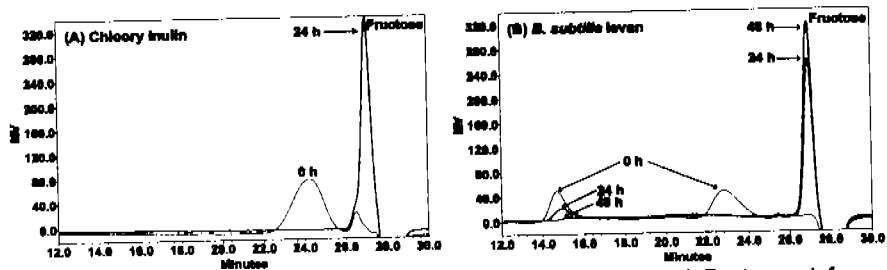


Figure 5. Molecular weight distribution of final hydrolysis products obtained with Fructozyme L from: A) chloory Inulin and B) *B. subtilis* levan. Black lines represent the initial product, green lines products after 24 hours of reaction, and red lines after 48 hours of reaction.

Figure 6

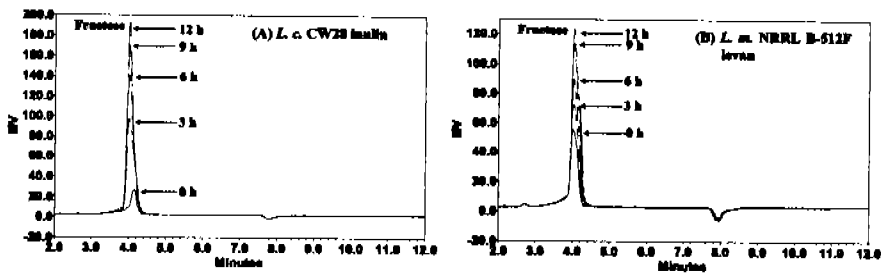


Figure 6. A) *L. citreum* CW28 Inulin and B) *L. mesenteroides* NRRL B-512F levan evolution during hydrolysis. No oligosaccharide formation is observed.

Figure 7

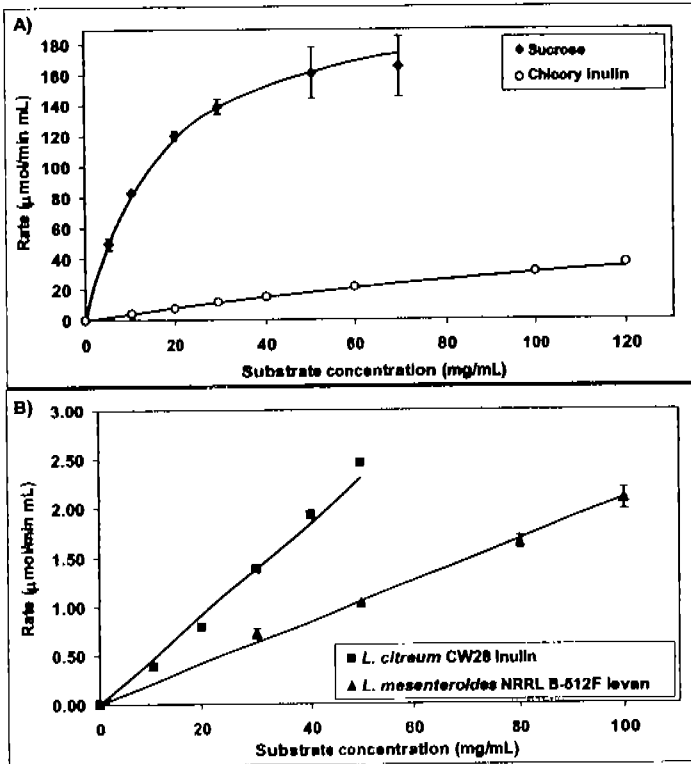


Figure 7. Fructans and sucrose hydrolysis kinetics with BfrA at pH 5.5 and 75 °C. Continued lines represent the adjustment with the Michaelis-Menten model for sucrose and chicory inulin and with a first order model for bacterial fructans. All rates are defined by mL of BfrA bearing 165 U/mL.

Figure 8

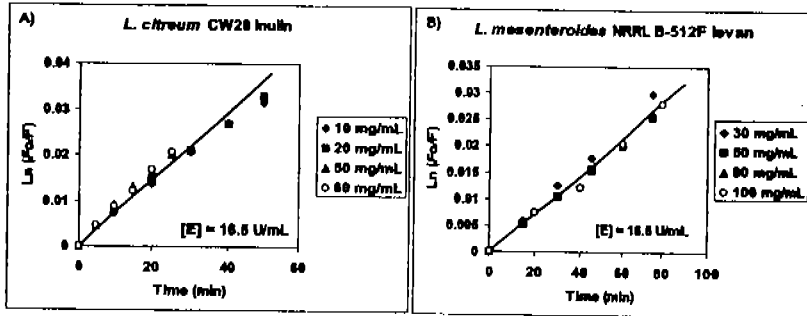


Figure 8. First order models describing bacterial fructan hydrolysis with BfrA at different substrate concentration (pH 5.5, 75 °C). Continuous lines represent the first rate adjustment.

Table(s)

Table I. Michaelis-Menten kinetic parameters calculated for the sucrose and two plant fractions hydrolysis with Fructozyme L and an exo-fructohydrolase from *T. maritima* (BfrA).

Fructozyme L		
Substrate	V_{max} (U/mL) ^(†)	K_m (mM)
Sucrose	29 876 ± 227	59.9 ± 0.6
Chicory inulin	34 117 ± 2246	7.2 ± 0.8 ^(‡)
<i>A. tequilana</i> Weber var. <i>azul</i> agavin	32 254 ± 3 301	27 ± 3.8 ^(‡)
BfrA		
Substrate	V_{max} (U/mL) ^(†)	K_m (mM)
Sucrose	215 ± 8.1	48.4 ± 4.24
Chicory inulin	97.6 ± 19.1	26.8 ± 5.8 ^(‡)

† Rate is defined by mL of Fructozyme L or mL of BfrA (Fructozyme L contains 25 323 U and BfrA 165 U of sucrose activity per mL).

‡ Chicory inulin and Agavin concentrations are based on a molecular average weight of 8.3 and 6.2 kDa respectively.

Table II. Molecular weight, kinetic properties (reaction model, pseudo first and second order rate constants) and conversion after 24h of reaction for fructans hydrolyzed with Fructozyme L and an *exo*-fructohydrolase from *T. maritima* (BfrA).

Fructozyme L						
Fructan	Molecular weight average (kDa)	Kinetic type	[E] (U/mL) ^(†)	$k' \times 1000$ (min ⁻¹)	k'' fructan / k'' chicory inulin (%) ^(‡)	Hydrolysis (%) ^(§)
(A) Chicory inulin	8.3	Michaelis Menten	6.3	25.6	100	86 ± 2.8
(B) <i>A. t.</i> Weber var. <i>axu</i> / agavin	6.2 ^(*)	Michaelia Menten	6.3	9.01	35.2	81 ± 0.9
(C) <i>L. c.</i> CW28 inulin	3000	First order	6.3	1.68	6.5	78 ± 1
(D) <i>B. s.</i> levan	8.3 ^(*) 3500	First order	63.3	4.88	1.9	53 ± 3.6
(E) <i>L. m.</i> ATCC 8293 levan	3000	First order	126.6	2.64	0.5	54 ± 0.1
(F) <i>L. m.</i> NRRL B-512F levan	2200	First order	126.6	2.66	0.5	44 ± 1.8
BfrA						
(G) Chicory inulin	8.3	Michaelis Menten	8.3	3.95	100	68 ± 4.4
(H) <i>L. c.</i> CW28 inulin	3000	First order	16.5	0.73	9.2	46 ± 0.8
(I) <i>L. m.</i> NRRL B-512F levan	2200	First order	16.5	0.36	4.5	41 ± 0.9

* The average degree of polymerization of agavin obtained as mentioned in materials and metoda was 36.9. *B. subtilis* levan is formed by two molecular weight distributions of 8.3 kDa and 3500 kDa average molecular weight.
† Enzyme concentration used during k' and k'' determination.
‡ As k'' cannot be calculated, fructans k'' are referred to the chicory inulin k'' .
§ During determination of conversion after 24h of hydrolysis reactions, an enzyme concentration of 15 U/mL was used with each fructan.