

Universidad Nacional Autónoma de México

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
BIOQUIMICAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA CELULAR Y BIOCATÁLISIS

Obtención de Fructo-oligosacáridos a partir de levanas  
bacterianas mediante el uso de endolevanasas

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO

De

Maestro en Ciencias

Presenta:

Q.A. Porras Domínguez Jaime Ricardo

Director de tesis:

Dr. Agustín López-Munguía Canales



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Ingeniería de Tecnología de Enzimas del Departamento Ingeniería Celular y Biocatálisis de Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de Dr. Agustín López-Munguía Canales y la asesoría técnica de la M. C. María Elena Rodríguez Alegría.

Los estudios de Maestría fueron posibles gracias al apoyo económico otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca No. 288923 y el proyecto de investigación No. 81637. De igual forma al apoyo económico otorgado por Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) a través del proyecto PAPIIT No. IN212311-3

**MIEMBROS DEL JURADO:**

**PRESIDENTE: DR. RAFEL VÁZQUEZ DUHALT**

**SECRETARIO: DR. LORENZO SEGOVIA FORCELLA**

**VOCAL: DR. ADELFO ESCALANTE LOZADA**

**VOCAL: DR. DANIEL GENARO SEGURA  
GONZÁLEZ**

**VOCAL: DRA. MARICARMEN QUIRASCO  
BARUCH**

## **Agradezco:**

A mi madre Martha Domínguez por todo su cariño y apoyo que siempre me ha brindado.

A mi esposa Mónica Avendaño por todo su amor, apoyo y comprensión.

A mis suegros Felipe Avendaño y Josefina Martínez por todo su apoyo y por abrirme las puertas de su casa.

A la Dra. Ángela Ávila Fernández por todas sus enseñanzas, consejos y sus ideas que fueron de gran importancia para las bases de este proyecto

A la M. C. María Elena Rodríguez Alegría, por sus enseñanzas, consejos y discusiones que fueron de mucho aporte en la elaboración de esta tesis.

A mi tutor el Dr. Agustín López-Munguía Canales por sus enseñanzas, por haberme orientado en mis estudios de maestría y sus aportaciones para poder realizar este proyecto.

A la Dra. Rina María González Cervantes y a la QFB Maricela Díaz de la UAM-Xochimilco por su contribución en los análisis de prebióticos

A los miembros de mi comité tutorial: Dra. Romina Rodríguez Sanoja, Dra. Marcela Ayala Aceves y a la Dra. Clarita Olvera Carranza por sus comentarios y aportaciones a este proyecto.

A los miembros de mi jurado de evaluación por sus comentarios durante la revisión de la tesis.

Al T.L. Fernando González Muñoz y a la T.L. Aurelia Ocampo por su ayuda con el apoyo técnico en los equipos del laboratorio.

A todos mis compañeros del laboratorio por haber hecho amena mi estancia en el laboratorio.

# ÍNDICE

1.- Introducción .....	2
2. Antecedentes.....	4
2.1 Fructanas.....	4
2.1.1 Levanas .....	5
2.1.2 Inulinas .....	6
2.1.3 Fructanas mezcladas .....	6
2.2 Síntesis de fructanas .....	7
2.2.1 Síntesis de levanas bacterianas .....	9
2.3 Propiedades de las fructanas.....	11
2.4 Producción de FOS.....	12
2.5 Levanasas.....	13
2.5.1 Endolevanasas hipotéticas. ....	15
3. Justificación .....	17
4. Hipótesis .....	17
5. Objetivos.....	18
5.1 Objetivo general .....	18
5.2 Objetivos específicos .....	18
6.- Estrategia experimental .....	19
7. Metodología y materiales. ....	21
7.1- Métodos generales de biología molecular.....	21
7.2.- Expresión de proteínas en <i>Escherichia coli</i> . ....	22
7.3.- Métodos generales de análisis de proteínas.....	23
7.4.- Producción de levanas bacterianas y agavina. ....	24
7.5.- Caracterización enzimática de las endolevanasas. ....	25
7.6.- Propiedades prebióticas.....	26
7.7 .- Métodos generales de identificación y análisis de productos. ....	26
8.- Resultados y Discusión .....	27
8.1 Producción de levana.....	27

8.2 Aislamiento de los genes de las endolevanasas de <i>Bacillus licheniformis</i> y <i>Bacillus subtilis</i> .....	38
8.3 Expresión de las proteínas recombinantes en un sistema heterólogo LevBs y LevBl. ....	40
8.4 Caracterización de LevBl y LevBs.....	4645
8.5 Producción de FOS mediante la enzima LevBl.....	50
8.5.1 Purificación de la enzima LevBl .....	50
8.5.2 Caracterización bioquímica de LevBl .....	51
8.5.3 Caracterización cinética de LevBl.....	53
8.5.4 Evaluación de LevBl empleando diferentes sustratos .....	54
8.5.5 Producción de FOS.....	58
8.5.6 Caracterización estructural de los productos obtenidos. ....	64
8.5.7 Capacidad prebiótica de los FOS obtenidos. ....	66
8.6 Producción FOS sistema combinado SacB y LevBl. ....	69
9. Conclusiones.....	70
10. Perspectivas .....	71
11. Bibliografía.....	71



# Índice de Figuras

Figura 1. Estructuras de los diferentes tipos de fructanas. ....	4
Figura 2. Estructura de la levana producida por SacB de <i>B. subtilis</i> .....	5
Figura 3. Estructura de la fructana de <i>Agave tequilana</i> Weber var azul. ....	7
Figura 4. Síntesis de fructanas. ....	8
Figura 5. Estructuras de moléculas base para la síntesis de fructanas vegetales. ....	9
Figura 6. Síntesis de fructanas en plantas .....	9
Figura 7 Diagrama de producción industrial de FOS .....	12
Figura 8. Actividad de la endolevanasa LevBs de <i>B. subtilis</i> cepa 168. ....	14
Figura 9. Resultados del análisis de alineamientos empleando Blast de la enzima LevBs. ....	15
Figura 10. Modelos creados por homología de LevBs y LevBl .....	16
Figura 11. Distribución bimodal del peso molecular de la levana producida por SacB. ...	27
Figura 12. Distribución de peso molecular de la levana producida por la levansacarasa de SacB sintetizada a una alta concentración de enzima.....	30
Figura 13. Distribución de peso molecular de la levana de SacB sintetizada con 0.1 U/mL de enzima.....	31
Figura 14. Distribución de peso molecular de la levana de SacB sintetizada a diferentes concentraciones de enzima .....	32
Figura 15. Evolución de la reacción de síntesis de levana de bajo peso molecular a diferentes concentraciones de sacarosa .....	36
Figura 16. Gel de agarosa de los genes de las endolevanasas LevBs y LevBl aislados de las cepas de <i>B. subtilis</i> cepa 168. y <i>B. licheniformis</i> .....	38
Figura 17. Mapa de restricción del vector pet22-b(+). ....	39

Figura 18. Gel de agarosa con los genes clonados en el vector de expresión .....	38
Figura 21. SDS-Page de las endolevanasas LevBl y LevBs expresadas en <i>E. coli</i> Rosseta 2.. .....	41
Figura 22. Ensayo de inmunodetección de las endolevanasas LevBl y LevBs.....	42
Figura 23. Estructura del DNS y ácido 3-amino-5 nitrosalicílico .....	43
Figura 24. Cromatografía en capa fina de la hidrólisis enzimática de la levana de <i>B. subtilis</i> empleando LevBl y LevBs. ....	44
Figura 25. Evolución de la hidrólisis enzimática de la levana de <i>L. mesenteroides</i> empleando LevBs y LevBl . .....	47
Figura 26. Cromatograma de la HPAEC-PAD de los productos de hidrólisis de la levana de <i>L. mesenteroides</i> , obtenidos con la endolevanasa de LevBs y de LevBl.....	48
Figura 27. Evolución de los productos de hidrólisis de la levana de <i>L. mesenteroides</i> B512 .....	49
Figura 28. SDS-page de las proteínas durante el proceso de purificación de LevBl expresada en <i>E. coli</i> .....	50
Figura 29. Efecto del pH en la actividad de la endolevanasa de LevBl. ....	51
Figura 30. Efecto de la temperatura en la actividad de la endolevanasa de LevBl. ....	52
Figura 31. Estudio cinético de LevBl empleando la levana de bajo peso molecular producida por SacB .....	53
Figura 32. Perfil de productos observado mediante TLC empleando levanas de diversas fuentes después de hidrolizar. ....	54
Figura 33. Cromatograma obtenido de la HPAEC-PAD de la hidrólisis de 4 tipos diferentes de levanas a 16 horas de reacción.....	55
Figura 34. Cuantificación de FOS mediante la hidrólisis de la mezcla final de FOS hasta fructosa empleando las enzimas comerciales Fructozyme L. ....	58

Figura 35. Evolución de los productos de reacción de la endolevanasa LevBl en HPAEC-PAD.	
Figura 36. Cinética de producción de FOS a 50 (A) y 100g/L (B) obtenidos de la hidrólisis de la levana de SacB. ....	60
Figura 37. Comparación de la velocidad de producción de fructosa en las cinéticas de producción de FOS .....	61
Figura 38. Evolución de la reacción en términos de los equivalentes fructosa en reacciones llevadas a cabo a 35 y 45° C.....	62
Figura 39. Evolución de la reacción en términos de liberación de fructosa en reacciones llevadas a cabo a 35 y 45° C empleando una concentración de 100g/L de levana de SacB. ....	63
Figura 40. Cromatograma obtenido por HPLC con detector de IR utilizando una columna preparativa para purificar FOS. ....	64
Figura 41. TLC de las fracciones obtenidas mediante HPLC preparativa .....	65
Figura 42. Cromatograma obtenido por HPAEC-PAD de los productos de hidrólisis de levana .....	65
Figura 43. Cinéticas de crecimiento y pH de diferentes bacterias probiótica empleando como única fuente los FOS producidos. ....	67
Figura 44. Cromatografía en capa fina de los productos de reacción del sistema simultaneo SacB/LevBl.....	69
Figura 45. Evolución de la producción de fructo-oligosacáridos empleado el sistema simultaneo SacB/LevBl .....	70
Figura 46. Cromatografía en capa fina los productos obtenidos a lo largo del tiempo durante la reacción simultánea . ....	71

## Índice de Tablas

Tabla 1. Principales propiedades de las Levansacarosas microbianas .....	10
Tabla 2. Efecto de la concentración de sacarosa y la temperatura en la síntesis de levana por la levansacarasa SacB de <i>B. subtilis</i> .....	28
Tabla 3. Resultados de la síntesis de levana de SacB a diferentes concentraciones de sustrato a 35°C.....	35
Tabla 4. Actividad de las endolevanasas LevBl y LevBs sobre fructanas de diversos orígenes.....	41
Tabla 5. Actividad enzimática obtenida en extractos celulares de cultivos de la cepa Rosseta 2 de <i>E. coli</i> .....	43
Tabla 6. Evolución de la reacción de hidrólisis de levana comparativa empleando las enzimas LevBs y LevBl.....	44
Tabla 7. Balance global de actividad en el proceso de purificación de la enzima LevBl expresada en <i>E. coli</i> .....	49
Tabla 8. Análisis de la actividad específica de la endolevanasa LevBl con respecto a cuatro diferentes levanas .....	54
Tabla 9. Comparación estructural de la levana producida por LevS y SacB .....	54

# Obtención de fructo-oligosacáridos a partir de levanas bacterianas mediante el uso de endolevanasas

## RESUMEN

Se aislaron los genes que codifican para las endolevanasas de los genomas de *Bacillus subtilis* cepa 168 y *Bacillus licheniformis*, que fueron clonados y expresados en la cepa de *Escherichia coli* Rosetta 2, comprobando la capacidad de las enzimas para hidrolizar parcialmente las levanas produciendo fructo-oligosacáridos (FOS). La enzima proveniente de la cepa de *B. licheniformis* (LevBl) resultó tener mayor actividad tipo endo, produciendo una menor concentración de fructosa que la enzima proveniente de la cepa de *B. subtilis* cepa 168 (LevBs), a partir de levana producida por la enzima LevS de *Leuconostoc mesenteroides* B512 a una concentración de 10 g/L, pH 6.0, 30°C. Dada esta especificidad, la enzima LevBl fue seleccionada para llevar a cabo el estudio de hidrólisis. Se encontró que LevBl actúa en condiciones óptimas a pH de 6.0 y a una temperatura de 35°C con un comportamiento cinético de primer orden cuando se emplea una levana de bajo peso molecular como sustrato (8.3 KDa). Empleando una concentración de 1.0 U/mL de la enzima LevBl es posible obtener rendimientos del 95% después de 120 minutos de reacción para producir FOS empleando concentraciones de 50 y 100 g/L de levana producida por SacB. El perfil de productos consiste en FOS con un grado de polimerización (GP) que va de 3 a 8, determinado por HPAEC-PAD. Finalmente se comprobó que estos compuestos pueden ser utilizados como única fuente de carbono por bacterias consideradas como probióticos.

## 1.- Introducción

Los prebióticos son ingredientes ampliamente utilizados en la elaboración de alimentos funcionales. Están definidos como “sustancias que son selectivamente fermentadas por la microbiota intestinal provocando cambios específicos en su composición y/o actividad, confiriendo beneficios sobre el bienestar y la salud del huésped”.<sup>1</sup> Dentro de los prebióticos más estudiados se encuentran las fructanas, que son compuestos formados por unidades de fructosa, divididos de acuerdo con su composición en dos grupos principalmente: los clasificados como inulina, donde predominan los enlaces  $\beta$  (2-1) entre las fructosas y los clasificados como levana, donde predominan los enlaces  $\beta$  (2-6). Cuando los polímeros tienen un grado de polimerización entre 2 y 10 unidades de fructosa, se denominan fructo-oligosacáridos (FOS).

Hasta la fecha, los FOS con enlaces  $\beta$  (2-1) son los azúcares con mayor y más amplia actividad prebiótica conocidos, de acuerdo con estudios efectuados tanto *in vitro*, así como en modelos *in vivo*.<sup>2</sup> Sin embargo, existe otra variedad de FOS, aquellos que podrían derivarse de las levanas y en los que predominan los enlaces  $\beta$  (2-6), cuya capacidad prebiótica no ha sido hasta la fecha bien caracterizada, y que por lo mismo constituyen productos con un amplio potencial comercial. Evidencias de esto son los estudios realizados con levanas de origen bacteriano en los que se comprobó su capacidad prebiótica en ratas<sup>3</sup>. Por otro lado ya se ha evaluado la capacidad prebiótica de FOS con enlaces  $\beta$  (2-6) encontrando que pueden ser fermentados por diferentes cepas del género *Bifidobacterium* produciendo ácidos orgánicos de cadena corta.<sup>4</sup>

Los FOS tipo inulina de uso comercial son producidos mayoritariamente utilizando endoinulinasas a partir de la hidrólisis de inulinas de origen vegetal como la de achicoria.<sup>5</sup> Por analogía, una alternativa para la producción de FOS tipo levana sería mediante la hidrólisis de fructanas de alto peso molecular de tipo  $\beta$  (2-6) mediante el uso de endolevanasas.

En el grupo de investigación del Dr. Agustín López-Munguía existen desde hace varios años proyectos relacionados con la síntesis de levanas.<sup>6,7,8</sup> Sin embargo este es el primer esfuerzo por

## INTRODUCCIÓN

estudiar enzimas que degraden de manera específica las levanas para la obtención de FOS. Dado del potencial comercial que tienen los FOS en la industria alimentaria, las levanas de origen bacteriano son un recurso, que puede ser producido a partir de sacarosa con la tecnología existente y utilizado como sustrato en una segunda etapa del proceso para la producción de nuevos FOS. De esta posibilidad surge el interés por encontrar enzimas capaces de hidrolizar enlaces  $\beta$  (2-6) en las fructanas bacterianas mediante un mecanismo tipo endo, evitando así la liberación de fructosa y dando como resultado FOS. Así, la búsqueda de endolevanasas bacterianas y su aplicación para la obtención de FOS constituyen las bases que definen los objetivos de este proyecto.

## 2. Antecedentes

### 2.1 Fructanas

Las fructanas son polímeros u oligómeros compuestos por unidades de fructosa unidas mediante enlaces del tipo  $\beta$  (2-1) clasificados como inulina y por enlaces del tipo  $\beta$  (2-6) conocidos como levanas. Existen otro tipo de fructanas que contienen ambos tipos de enlaces y son llamadas fructanas mezcladas. Tal es el caso de la fructana de agave, mejor conocida como agavina (figura 1). Un punto importante a destacar dentro de las estructuras de estos carbohidratos es la presencia de una unidad de glucosa, generalmente localizada en el extremo de la cadena, lo que resulta de la forma en que son sintetizadas, agregando unidades de fructosa a una molécula inicial de sacarosa, proceso que se detallará más adelante. Las fructanas que tienen un grado de polimerización de entre 2 y 10 unidades de fructosa son clasificadas como oligosacáridos y son mejor conocidos como fructo-oligosacáridos (FOS).

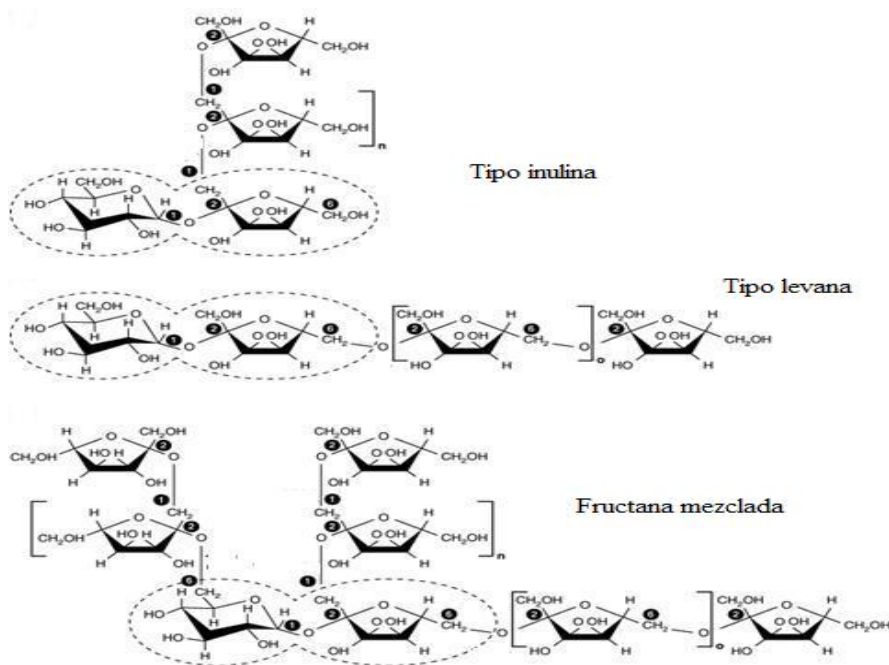


Figura 1. Estructuras de los diferentes tipos de fructanas.<sup>9</sup>



### 2.1.1 Levanas

La levana es un homopolisacárido constituido por moléculas de fructosa unidas mediante enlaces  $\beta$  (2-6) con ramificaciones en  $\beta$  (2-1) cuya proporción varía dependiendo del origen de la enzima levansacarasa que la sintetiza. Las levansacarosas son producidas por un amplio grupo de bacterias dentro de las cuales destacan *B. subtilis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Zymomonas mobilis*, *Serratia spp.*, *Microbacterium laevaniformans*, etc.<sup>7, 8, 10, 11</sup> Algunas especies de plantas también contienen este tipo de azúcares, aunque en muy baja proporción, como es el caso del pasto azul (*Poa secunda*).<sup>12</sup>

En los microorganismos las levanas cumplen principalmente las funciones de reserva y de factor de adherencia a superficies.<sup>12</sup> Las levanas de origen microbiano pueden llegar a tener más de diez mil residuos de fructosa en la cadena principal. Tal es el caso de la levana producida por la levansacarasa SacB de *B. subtilis* la cual tiene una distribución de pesos moleculares de tipo bimodal, con valores promedio de alrededor de 8.3 KDa y de 3500 KDa.<sup>8</sup>

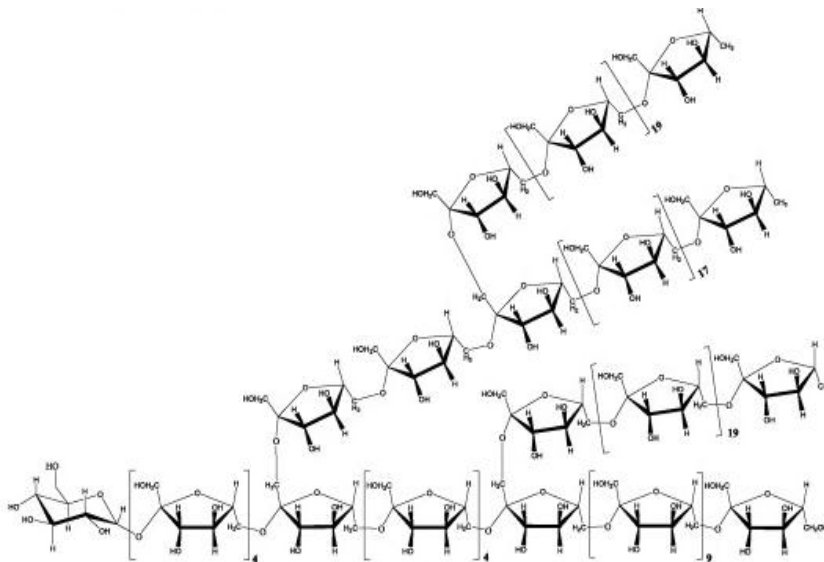


Figura 2. Estructura de la levana producida por SacB de *B. subtilis*.<sup>10</sup>

En la figura 2 se muestra la estructura de la levana de SacB propuesta por *Tanaka et al.* en 1980. Se observan ramificaciones cada 4 residuos de fructosa unidas por enlaces del tipo  $\beta$  (2-1) a la cadena principal.<sup>10</sup>

### 2.1.2 Inulinas

La inulina es un homopolisacárido de fructosa en el que predominan los enlaces del tipo  $\beta$  (2-1). Las inulinas son sintetizadas por algunas bacterias, mientras que en las plantas constituyen un polisacárido de reserva, el segundo de mayor importancia después del almidón. Son sintetizadas y almacenadas en la vacuola y acumuladas en órganos especializados como la raíz, en el caso de la achicoria en el tubérculo, o el bulbo en el caso de la cebolla, etc.<sup>13</sup>

Las inulinas vegetales pueden presentar ramificaciones mediante enlaces del tipo  $\beta$  (2-6) y su grado de polimerización es mucho menor al alcanzado en las fructanas bacterianas. Las inulinas vegetales contienen un máximo de 200 unidades de fructosa.<sup>13</sup> También se han encontrado algunas especies de hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium* con la capacidad de producir inulinas de bajo peso molecular.<sup>14</sup>

### 2.1.3 Fructanas mezcladas

Las fructanas mezcladas están formadas tanto por enlaces del tipo  $\beta$  (2-1) como del tipo  $\beta$  (2-6). Tal es el caso de las fructanas presentes en plantas del género *Agave*, mejor conocidas como agavinas las cuales tienen un grado de polimerización de entre 3 y 30 unidades de fructosa con un peso molecular de 6.2 KDa aproximadamente (figura 3).<sup>15</sup>

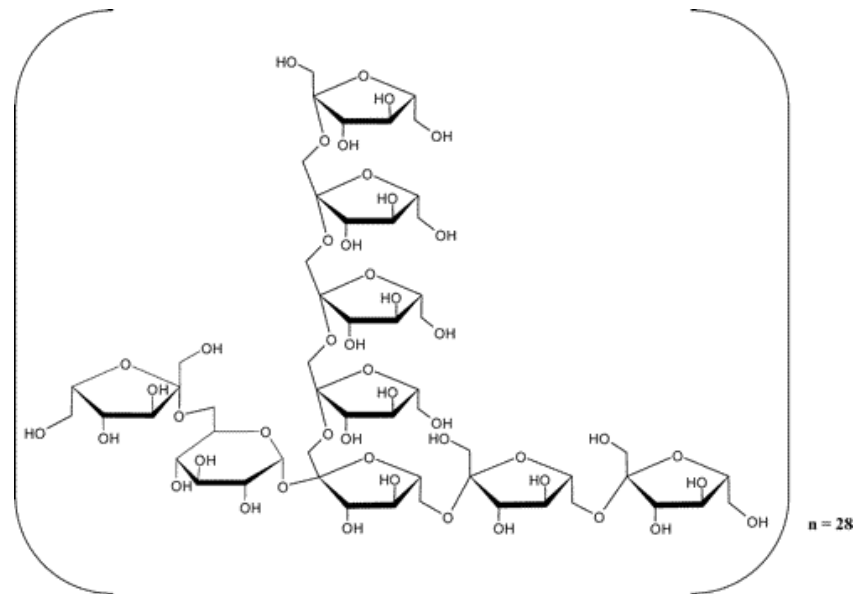


Figura 3. Estructura de la fructana de *Agave tequilana* Weber var azul.<sup>15</sup>

La agavina es una fuente de reserva de carbohidratos en el agave, que ayuda además a la planta a desarrollarse en ambientes secos y a que se lleve a cabo la floración.<sup>16</sup> La concentración de este polisacárido en las plantas es en promedio de alrededor del 26% p/p peso en seco.<sup>17</sup>

Antiguamente este polisacárido sólo era usado, después convertirlo mediante hidrólisis térmica o ácida a fructosa, como materia prima para la producción de bebidas alcohólicas mediante fermentación y posterior destilación. Actualmente también se comercializan jarabes para ser utilizados como edulcorantes o directamente la inulina como producto seco por sus propiedades como fibra soluble y prebióticas.<sup>18</sup>

## 2.2 Síntesis de fructanas

Las fructanas son producidas por enzimas denominadas fructosiltransferasas (FTFs), dentro de las cuales, en el ámbito microbiano pueden ser del tipo levansacarasas que sintetizan levana y o inulosacarasas que sintetizan inulina.

## ANTECEDENTES

Las fructosiltransferasas catalizan la transferencia del grupo fructosilo de una molécula de sacarosa a la fructosa de una molécula aceptora (sacarosa o polímero en crecimiento), al tiempo que liberan al medio de reacción la glucosa que se encontraba unida al grupo fructosilo donado (figura 4). La energía almacenada del enlace glicosídico de la sacarosa permite la transferencia eficiente de un residuo fructosilo para la formación del producto por lo que no requiere de cofactores ni compuestos fosforilados de alta energía para formar el polímero.<sup>19</sup>

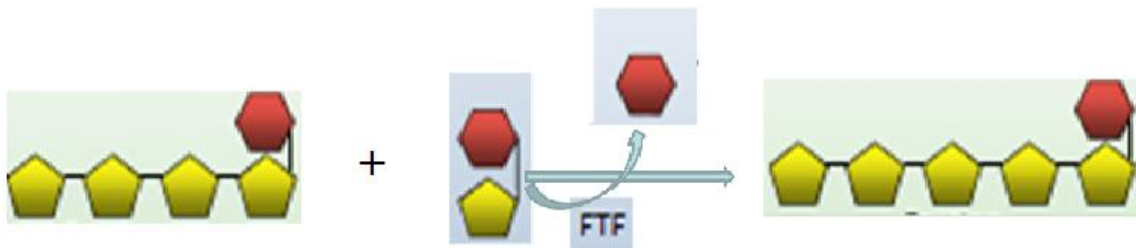


Figura 4. Síntesis de fructanas.

Es importante mencionar que en bacterias sólo se requiere de una sola enzima para llevar a cabo la síntesis de estos polisacáridos, pero en plantas la síntesis es más compleja y se requiere de más de una enzima. La síntesis de fructanas en vegetales parte de igual forma de la sacarosa proveniente de la fotosíntesis pero se requiere sintetizar previamente una molécula base a partir de la cual procede la elongación del polímero. La molécula base puede ser 1-kestosa, 6-kestosa, neokestosa, o birfucosa (figura 5), y mediante la participación de diferentes enzimas se lleva a cabo la elongación de las cadenas dando lugar a la formación de las diferentes series de fructanas vegetales, como se ilustra en la figura 6.<sup>13</sup>

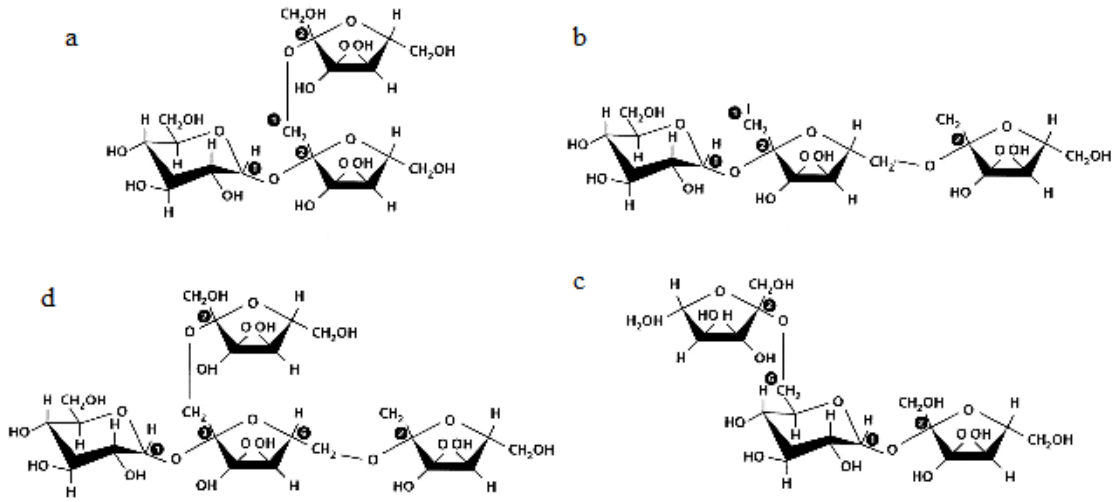


Figura 5. Estructuras de moléculas base para la síntesis de fructanas vegetales. a) 1-kestosa, b) 6-kestosa, c) neokestosa, d) bifurcosa.<sup>13</sup>

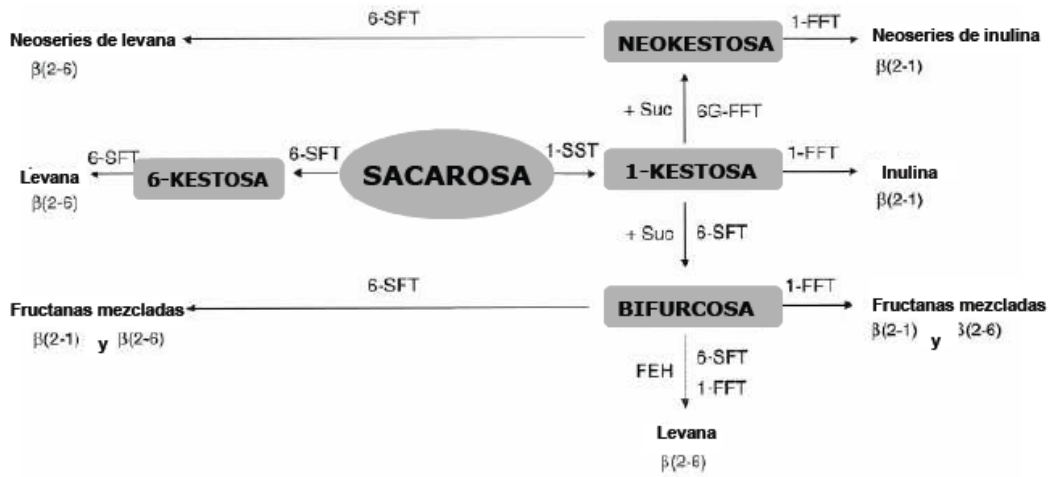


Figura 6. Síntesis de fructanas en plantas. 1-FFT, fructana:fructana 1-fructosiltransferasa; 1-SST, Sacarosa:Sacarosa 1-fructosiltransferasa; 6G-FFT, fructana:fructana 6Gfructosiltransferasa; 6-SFT, Sacarosa:fructana 6-fructosiltransferasa.<sup>13</sup>

### 2.2.1 Síntesis de levanas bacterianas

Como anteriormente se señaló, en contraste con las plantas, la síntesis microbiana de fructanas requiere de sólo una actividad de FTF para catalizar la reacción de formación de fructanas, ya que no se requiere de la formación de una molécula base. Las levansacarosas bacterianas han sido ampliamente caracterizadas siendo responsables de la síntesis de levanas mediante la transferencia de grupos  $\beta$ -fructosilos inicialmente a la sacarosa y posteriormente a las moléculas de levana que van creciendo a partir de la sacarosa uniendo fructosas en enlaces del tipo  $\beta$  (2-6).<sup>19</sup>

Alternativamente, las levansacarosas pueden utilizar como aceptor al agua en reacciones de hidrólisis. Utilizando altas concentraciones de sacarosa la reacción de polimerización desplaza a la de hidrólisis, obteniéndose mayores rendimientos en la producción de polímeros y menor hidrólisis. En la tabla 1 se resumen las propiedades de diversas levansacarosas reportadas en la literatura.

Tabla 1. Principales propiedades de las Levansacarosas microbianas

Organismo	Enzima	Substrato	Producto	M <sub>r</sub> (kDa)	T (°C)	pH	pl	Km Sac
<i>Bacillus subtilis</i>	Lev	Sac	Len	75.0	30	5.5	nd	4.0
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Lev	Sac	Len, 1-k	nd	30	nd	nd	nd
<i>Bacillus megaterium</i>	Lev	Sac	Len, 1-k, 6-k, nys	52.0	45	6.0	nd	6.6
<i>Erwinia amylovora</i>	Lev	Sac	Len	46.0	28	nd	4.0	nd
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Lev	Sac	Len, 1-k, nys	58.0	30	5.0	5.5	11.8
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	Lev	Sac	Len, 1-k	73.0	35	5.4	nd	13.1
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Lev	Sac	Len	90.0	30	6.0	nd	36.7
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Lev	Sac	Len	103.0	30	6.2	nd	26.6
<i>Pseudomonas s. phaseolicola</i>	Lev	Sac	Len	45.0	18	6.2	3.5	160.0
<i>Rahnella aquatilis</i>	Lev	Sac	Len	120.0	60	6.0	nd	50.0
<i>Zymomonas mobilis</i>	Lev	Sac	Len	56.0	50	5.0	2.6	122.0
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Lev	Sac, raf	Len	63.8	50	4.5	nd	21.0

Lev-Levansacarasa, Sac-Sacarosa, 1-k 1-Kestosa, nys - nistosa, raf -rafínosa . Len-levana. Mr - Peso molecular de la enzima, T y pH óptimos de las enzimas.<sup>19</sup>

Dentro de las levansacarosas, las enzimas SacB de *B. subtilis*, LevC y LevS de *L. mesenteroides* han sido ampliamente estudiadas en nuestro laboratorio.<sup>6,7,8</sup> De hecho, esta última fue reportada inicialmente por nuestro grupo de trabajo, habiéndose determinado y reportado las características bioquímicas de LevS.

## 2.3 Propiedades de las fructanas

Las fructanas tanto de bajo como de alto peso molecular, son compuestos muy utilizados en la industria alimentaria en la elaboración de alimentos funcionales por su contribución a mejorar la salud del consumidor. La naturaleza del enlace de las fructanas, tanto inulinas como levanas, hace que estas no sean degradadas en el tracto gastrointestinal, soportando las condiciones ácidas del estómago y la actividad glícólítica de las enzimas digestivas. Sin embargo estos compuestos pueden ser hidrolizados y fermentados por la microbiota conocida como probióticos, compuesta por bacterias de los géneros *Lactobacillus spp.* y *Bifidobacterium spp.* Por todo lo anterior las fructanas son clasificadas como fibra soluble y como prebióticos.<sup>1</sup>

Las fructanas no solamente son utilizadas como prebióticos, sino que también tienen otras aplicaciones tecnológicas en la industria alimentaria como sustitutos de grasas en la elaboración de alimentos con bajo contenido calórico o como agentes espesantes y emulsificantes.<sup>20</sup>

Un estudio demostró que bacterias del género *Bifidobacterium* presentan un mayor desarrollo *in vitro* utilizando FOS tipo inulina, presentado un bajo crecimiento microbiano con inulinas de pesos moleculares superiores a las 20 unidades de fructosa.<sup>21</sup> Aunado a esto, la ventaja de una mayor solubilidad, dulzura y una baja viscosidad de los FOS frente a fructanas de alto peso molecular, surge un mayor interés en el empleo y producción de estos oligómeros.<sup>22</sup>

## 2.4 Producción de FOS

En la industria alimentaria, la producción de FOS como prebióticos para la elaboración de alimentos funcionales está en aumento. Actualmente los FOS se producen por dos métodos. El primero se basa en la hidrólisis de la inulina extraída de las raíces de achicoria por acción de endoinulinasas, enzimas que hacen cortes al interior de la molécula de inulina generando oligómeros con un grado de polimerización entre 2 y 8. El otro método es a través de FTFs de origen fúngico, principalmente de *Aspergillus spp.* y *Penicillium spp.*, que sintetizan directamente los FOS a partir de sacarosa. Ambos procesos se ilustran en la figura 7.<sup>22</sup>

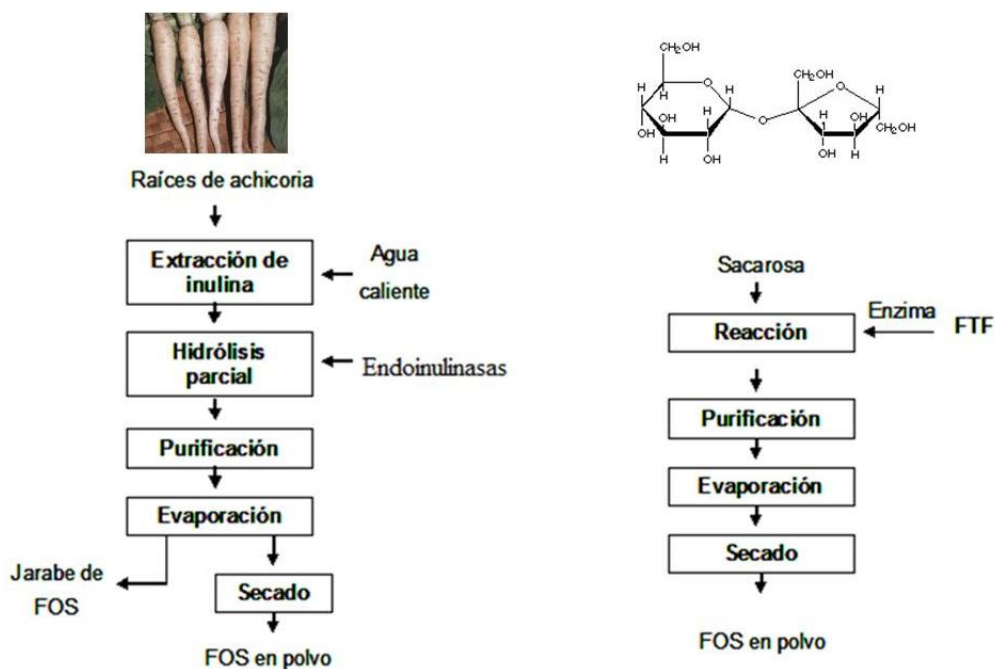


Figura 7. Diagrama que describe las etapas principales de los procesos industriales para la producción de FOS.<sup>22</sup>

Cabe mencionar que en estos dos sistemas de producción sólo se obtienen FOS del tipo  $\beta$  (2-1), ya que como se señaló anteriormente hasta el momento no existe producción industrial de FOS  $\beta$  (2-6) a pesar de que se ha comprobado que tienen propiedades prebióticas en ratas<sup>3</sup> y que pueden ser fermentados por bacterias benéficas del género *Bifidobacterium spp.*<sup>4</sup> Así, una alternativa para la



producción de FOS  $\beta$  (2-6) es hacerlo a partir de la hidrólisis de levanas bacterianas de alto peso molecular producidas eficientemente mediante las enzimas levansacarasas. Para esto se requiere de endolevanasas capaces de hacer cortes internos en las levanas, es decir, capaces de hacer una hidrólisis parcial de polímeros con enlaces  $\beta$  (2-6) con baja especificidad hacia FOS de bajo peso molecular con el fin de evitar o minimizar la liberación de fructosa.

## 2.5 Levanasas

Las levanasas son enzimas pertenecientes a la familia 32 de las glicósil hidrolasas. A esta misma familia pertenecen enzimas como las invertasas y las inulinasas. Las levanasas son enzimas capaces de hidrolizar los enlaces del tipo  $\beta$  (2-6) entre dos moléculas de fructosa. En función del sitio en donde actúan estas enzimas pueden clasificarse en dos grandes grupos correspondientes a *exo* y *endo*levanasas como se describe a continuación.

- a)  **$\beta$  – Fructofuranosidasas.** Dentro de este grupo de enzimas se encuentran las *exo*-levanasas y las 2,6- $\beta$ -fructan-6-levanbiohidrolasas. Estas enzimas hidrolizan las fructanas en los extremos, produciendo fructosa o levanobiosa principalmente (dímero de fructosa con enlace  $\beta$  (2-6) en el caso de las levanobiohidrolasas).<sup>23</sup>
- b) **Endolevanasas.** Este grupo incluye a las enzimas que hidrolizan enlaces internos  $\beta$  (2-6) produciendo FOS.

Como ya se señaló, el interés para una producción eficiente de FOS es importante seleccionar aquellas enzimas que producen FOS liberando la menor cantidad de fructosa posible, debido a que esta última no es un prebiótico, además de que aumenta el valor calórico e índice glucémico de la mezcla de azúcares, teniendo que ser separada del producto. Por esta razón quedan descartadas todas aquellas enzimas con actividad *exo* que hidrolizan las fructanas en fructosa. Dentro de las enzimas reportadas capaces de producir FOS con bajo contenido de fructosa se encuentran la LF2ase de *Streptomyces exfoliatus*<sup>24, 25</sup> y la LevM de *Microbacterium laevaniformans*<sup>26</sup>, aunque estas enzimas sólo son capaces de hidrolizar levanas teniendo como producto principal a la levandiosa debido a su actividad del tipo *exo*.

Hasta ahora no se han caracterizado en forma detallada enzimas que produzca FOS con un GP>2. Existe un antecedente en el que lograron aislar una enzima capaz de hidrolizar levana de forma endo a partir de una especie de *Bacillus sp.* cepa aislada del suelo.<sup>27</sup> Mas recientemente Pereira *et al.* (2001) al estudiar el operón en donde se encuentra la enzima SacB responsable de síntesis de levana en la cepa de *Bacillus subtilis* cepa 168, encontraron una enzima (LevBs) con actividad endolevanasa que fue parcialmente caracterizada. Por su actividad de endolevanasa esta enzima nos resultó interesante para explorar la posible producción de FOS a partir de levanas.

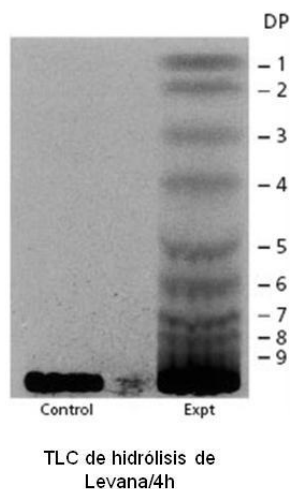


Figura 8. Actividad de la endolevanasa LevBs de *B. subtilis* cepa 168.

En la figura 8 se observa el perfil de productos que resulta de la hidrólisis parcial de la levana producida por *B. subtilis* empleando la endolevanasa LevBs. En esta cromatografía de capa fina se observa que los productos van de un DP entre 1 y 9 entre los cuales se encuentran la fructosa y los fructo-oligosacáridos.

2.5.1 Endolevanasas hipotéticas.

Por medio de un análisis de Blast, utilizando la secuencia de la endolevanasa de *B. subtilis* (*LevBs*), se encontró en la base de datos del NCBI que existen proteínas de varios microorganismos con una identidad mayor al 50% con *LevBs*. De las proteínas encontradas, algunas de las que poseen una identidad menor al 60% ya han sido caracterizadas y no poseen actividad endolevanasa, mientras que aquellas con una identidad superior al 60%, están reportadas como endolevanasas hipotéticas, aunque dado que poseen mayor identidad con *LevBs* es probable que se trate de enzimas capaces de producir FOS (figura 9).

Microorganismo	% de identidad
<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42	75%
<b><i>B. licheniformis</i> ATCC 14580</b>	<b>66%</b>
<i>B. megaterium</i> QM BI551	66%
<i>Streptomyces exfoliatus</i>	52%
<i>S. viridochromogenes</i> DSM 40736	50%
<i>Microbacterium laevaniformans</i>	49%

**Endolevanasas**

Las enzimas de *S. exfoliatus* y *M. laevaniformans* han sido estudiadas y clasificadas como levانبiohidrolasas.

Figura 9. Resultados del análisis de alineamientos empleando Blast con la enzima *LevBs* de *B. subtilis* cepa 168.

De las proteínas señaladas se seleccionó la de *B. licheniformis*, con un porcentaje de identidad de 66% con la *LevBs* de *B. subtilis*. La evidencia de que *B. licheniformis* produce una levana de alto peso molecular nos da otro indicio de que si este microorganismo es capaz de sintetizar el polímero también podría poseer las enzimas capaces de hidrolizarlo.<sup>29 y 30</sup>

Las enzimas de la familia 32 comparten una estructura terciaria compuesta por un dominio de sándwich  $\beta$  en el extremo C-terminal y un dominio de  $\beta$ -propela en el extremo N-terminal (figura 10), además está altamente conservados los aminoácidos catalíticos y el motivo RDP de unión al grupo fructosilo en todas las enzimas pertenecientes a esta familia.

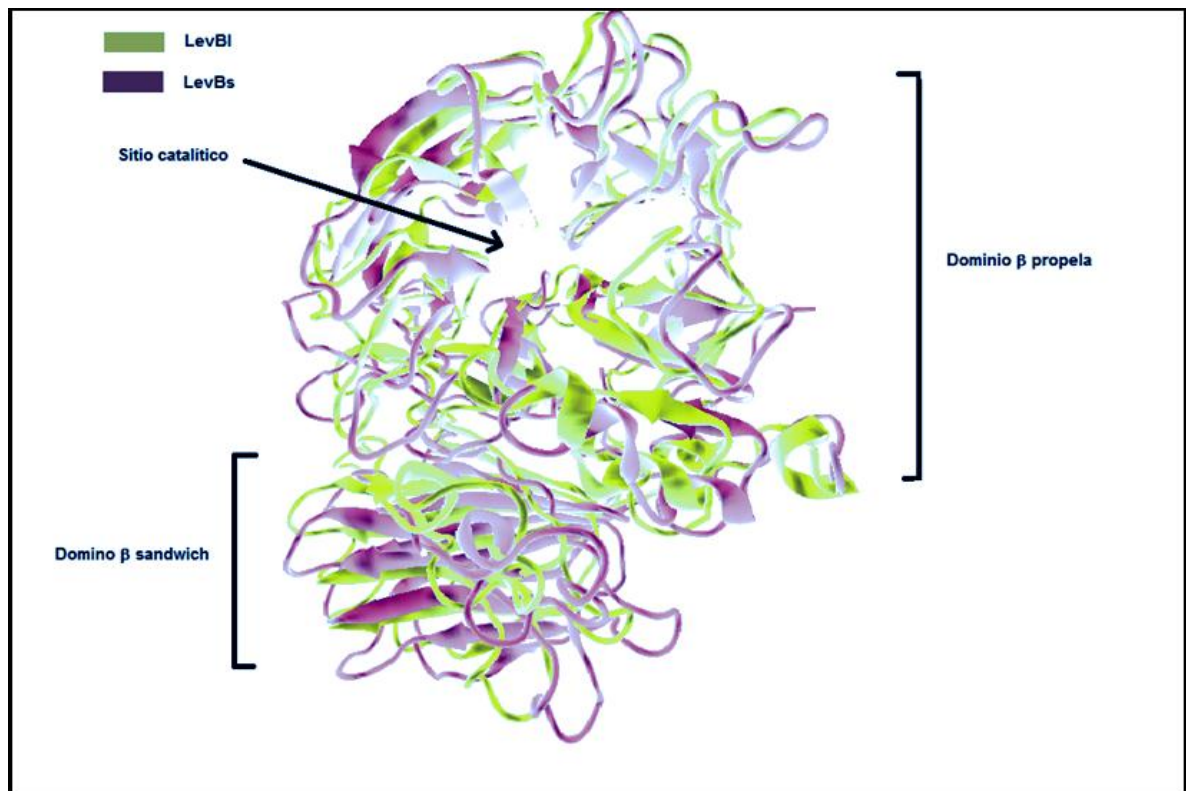


Figura 10. Modelos creados por homología empleando el servidor ITASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), a partir de alineamientos con enzimas de la familia GH32, minimizados con el servidor YASARA (<http://www.yasara.org/minimizationserver.htm>)

### 3. Justificación

Debido a la importancia en la industria alimentaria de los fructo-oligosacáridos actualmente derivados de la hidrólisis de inulina, resulta atractivo explorar la posibilidad de incorporar a este sector los fructo-oligosacáridos obtenidos de las levanas, para lo cual se requiere estudiar y caracterizar enzimas del tipo endolevanasa para su obtención. Estas enzimas podrían ser LevBs de *Bacillus subtilis* y/o LevBl de *Bacillus licheniformis*.

### 4. Hipótesis

A partir de la enzima endolevanasa LevBs de *B. subtilis* y/o la enzima hipotética LevBl de *B. licheniformis* será posible obtener fructo-oligosacáridos del tipo  $\beta$  (2-6) con propiedades prebióticas a partir de la hidrólisis parcial de levanas bacterianas, bajo condiciones específicas de reacción.

## 5. Objetivos

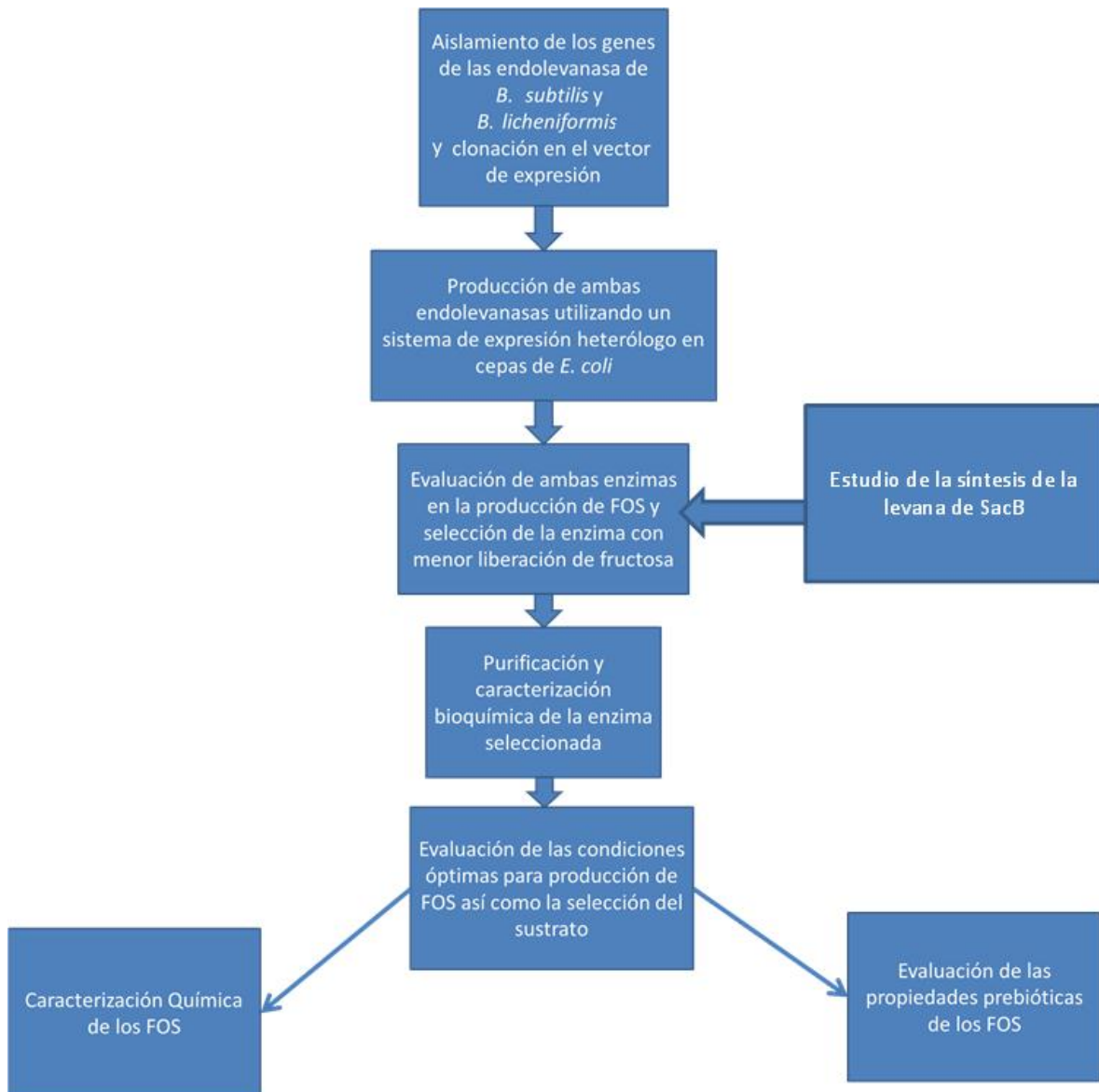
### 5.1 Objetivo general

Estudiar la obtención de fructo-oligosacáridos a partir de fructanas bacterianas del tipo levana mediante el uso de endolevanasas recombinantes.

### 5.2 Objetivos específicos

- Analizar y aislar el gen que codifica para LevBI de *Bacillus licheniformis* y LevBs de *Bacillus subtilis* y clonarlos en un vector de expresión.
- Producir las enzimas recombinantes en un sistema heterólogo y probar su eficiencia en la producción de fructo-oligosacáridos usando levanas bacterianas.
- Estudiar las condiciones para la producción de fructo-oligosacáridos de la enzima seleccionada.
- Seleccionar la levana más adecuada para el proceso y definir las condiciones para su síntesis.
- Caracterizar químicamente los productos de hidrólisis.
- Evaluar las propiedades prebióticas de los productos obtenidos.

## 6.- Estrategia experimental



## 7. Metodología y materiales.

### 7.1- Métodos generales de biología molecular.

**7.1.1 Obtención de ADN genómico.** Se inocularon 5 mL de medio LB con la cepa de *B. subtilis* cepa 168 o *B. licheniformis* (cepa no conocida) donadas por el laboratorio del Dr. Enrique Merino del Instituto de Biotecnología de la UNAM. El cultivo se incubó a 37°C durante 16 h a 250 rpm. Las células se cosecharon por centrifugación a 15,000 rpm durante 3 min y el ADN genómico se extrajo utilizando el sistema UltraClean Microbial ADN isolation kit (Mo Bio Laboratories, Inc), siguiendo las instrucciones del fabricante.

**7.1.2 Análisis de ADN en gel de agarosa.** Se prepararon geles de agarosa al 1% en amortiguador TAE 0.5X. Se mezclaron de 1 a 5 µL de las soluciones que contienen ADN con 2 µL del amortiguador de carga y posteriormente se colocaron en los pozos del gel. La electroforesis se desarrolló en amortiguador TAE 0.5X a 100 mV durante 40 min. Los geles se tiñeron en solución de bromuro de etidio 0.02% durante 1 min y se destiñeron en agua durante 20 min.

**7.1.3 Reacciones de amplificación (PCR).** Las amplificaciones se desarrollaron con la enzima Expand High Fidelity PCR System (Roche) bajo las siguientes condiciones generales: Desnaturalización inicial: 5 min a 94°C; Hibridación de 35 ciclos: 15 s a 94°C, 30 s a 58°C y 2 min por kb a 68°C; Extensión final: 7 min a 68°C. Se utilizó como templado el ADN genómico de *B. subtilis* cepa 168 con los oligonucleótidos *LveBs HEmad*- (CAT GCC ATG GAA CAT GAC CAA AAA ACA AAA TC) e *LveBs fin*- (ACG CTC GAG TTC ATG AAT CGA ATC AAA GTG), y el ADN genómico de *B. licheniformis* con los oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de la endolevanasa hipotética de *B. licheniformis* ATCC 14580 *LevBl EKmad*-(CAT GCC ATG GAA AAA AAG GGA GAA TCT CCG) y *LevBl fin*- (ACG CTC GAG ATC GCG GAT TGA ACG CAA ATG). Los productos de la amplificación se purificaron con el sistema High Pure PCR product purification kit (Roche Diagnostics).

**7.1.4 Digestiones.** Las digestiones de los fragmentos de PCR y del vector pET-22b(+) se realizaron por separado con 10 U de las enzimas Nco I y Xho I (New England Biolabs) en un volumen final de



## METODOLOGÍA Y MATERIALES

50  $\mu$ L durante 16 h a 37°C. Adicionalmente, el vector se trató durante 1 h con 10 U de fosfatasa alcalina (Biolabs) a 37°C.

**7.1.5 Ligaciones.** Las ligaciones de los fragmentos de PCR con el vector pET-22b(+) se realizaron con la enzima ligasa T4 ADN (Fermentas) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, utilizando una relación inserto:vector 5:1 e incubando la ligación a 20°C durante 2 h.

**7.1.6 Transformaciones en *E. coli*.** Las transformaciones se llevaron a cabo con 10  $\mu$ L de la ligación o con 0.5  $\mu$ L de plásmido superenrollado en células electrocompetentes. Estas se recuperaron en 500  $\mu$ L de medio SOC durante 1 h a 37°C y se seleccionaron en placas de LB con ampicilina 80  $\mu$ g/mL.

**7.1.7 Secuenciación.** La secuencia nucleotídica de los fragmentos de interés se determinó en un secuenciador automático Applied Biosystem 3100 en la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Los ensayos de secuenciación se realizaron en ambos sentidos por duplicado.

## 7.2.- Expresión de proteínas en *E. coli*.

**7.2.1 Expresión de los genes de LevB<sub>s</sub> de *B. subtilis* y LevBI de *B. licheniformis* y obtención del extracto enzimático.** Para producir las enzimas recombinantes una colonia de *E. coli* (BL21 CP, C41 , Origami, R2) transformada con cada plásmido se inoculó en 50 mL de medio YT2X en matraces de 150 mL e incubadas a 37°C y 250 rpm hasta alcanzar una OD<sub>600</sub>=0.5. La inducción se realizó con 0.4 mM de IPTG durante 18 h a 18°C y 90 rpm. Las células fueron colectadas mediante centrifugación a 12 000 rpm durante 15 min y posteriormente se lavaron 2 veces en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.0. Las células se resuspendieron en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.0 y se rompieron mediante sonicación con 3 pulsos de 15 s y se centrifugaron a 14 000 rpm durante 15 min. El sobrenadante (extracto enzimático) fue separado de los restos celulares y se analizó por separado.

### 7.3.- Métodos generales de análisis de proteínas.

**7.3.1 Cuantificación de proteína.** La proteína total del extracto enzimático fue cuantificada mediante el sistema Protein Assay (Bio-Rad) basado en el método de Bradford y utilizando una curva de seroalbúmina bovina (BSA) como estándar. Los ensayos se realizaron por duplicado

**7.3.2 Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE).** Las proteínas fueron analizadas por electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida al 8% después de mezclarse con amortiguador de carga adicionado con 10% de  $\beta$ -mercaptoetanol y calentarse a 94°C durante 5 min. Se cargó el gel con 30  $\mu$ g de cada proteína y la electroforesis se desarrolló a 10 mA durante aproximadamente 1 hora y media. Los geles fueron teñidos durante 20 min con solución de azul de Coomassie 0.125% y desteñidos durante 20 min con solución desteñidora I (ac. acético 10%, metanol 50%). Para terminar de desteñir se utilizaron la solución desteñidora II (ac. acético 7%, metanol 5%) por 2 h.

**7.3.3 Inmunodetección.** Las proteínas fueron transferidas a partir de un gel de poliacrilamida al 8% a una membrana de nitrocelulosa Hybond-ECL (Amersham Biosciences) utilizando la cámara de transferencia semi-seca TE-70 (Amersham Biosciences) operada a 150 mA durante 45 min. La membrana fue bloqueada durante una hora en solución PBS 1X con 0.5% de leche Svelty (w/v) y lavada 2 veces con PBS 1X durante 10 min. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo Penta-His HRP Conjugate (Quiagen) diluido 1:5000 en PBST (PBS 1X con Tween 80 0.05%) durante 2 h a temperatura ambiente y se realizaron 3 lavados de diez min con PBST y 2 con PBS 1X. Para revelar se agregaron a la membrana 4 mL del reactivo TMB (Zymed) y se agitó hasta ver la aparición de las bandas. Como control positivo se utilizó el marcador BenchMark Protein Ladder (Invitrogen).

### 7.4.- Producción de levanas bacterianas y agavina.

**7.4.1 Levanas de *B. subtilis* cepa 168.** La levanas de *B. subtilis* cepa 168 fueron producidas utilizando las enzimas recombinante SacB obtenida por el método descrito por Ortiz-Soto (2008).

**7.4.2 Producción de levana de bajo peso molecular de *B. subtilis* cepa 168.** Este estudio se llevó a cabo empleando concentraciones de sacarosa de 100, 200, 300, 400, 500 y 600 g/L a tiempos finales de reacción de 24 h para 35°C y 72 h para 4°C, en volúmenes de reacción de 500 µL. Las cinéticas de 200,400 y 600 g/L a 35°C con una concentración de enzima de 5 U/mL se llevaron a cabo incubando volúmenes de 500 µL en intervalos de 3 horas durante 27 h. La enzima se inactivó sometiendo las reacciones a una temperatura de 90°C durante 10min. Los ensayos se realizaron por duplicado.

**7.4.3 Producción de la levana de *L. mesenteroides* B512 y ATCC 8293.** La levanas de *L. mesenteroides* fueron producidas utilizando las enzimas recombinantes LevS de la cepa B512 y la enzima LevC de la cepa ATCC 8293, utilizando una concentración de sacarosa de 10%, con una concentración de enzima 1 U/mL 30 °C y a un pH de 6.<sup>7,8</sup>

**7.4.4 Precipitación de levanas.** Las levanas se recuperaron mediante precipitación con etanol, a partir de los medios de reacción previamente mencionados, utilizando etanol a 4°C en una relación etanol:solución de 3:1. Después de filtrar, la levana se resuspendió en agua y se precipitó nuevamente. Los polímeros obtenidos fueron dializados para eliminar los restos de etanol, glucosa, fructosa y sacarosa y posteriormente liofilizados y almacenados.<sup>23</sup>

**7.4.5 Extracción de la agavina de *A. tequilana* Weber var. azul.** La agavina fue extraída con agua a una relación kg agave/ L agua de 1/3 usando agave desgarrado con un diámetro aproximado de partícula de 2 cm a 60°C durante 4 horas en agitación de 320 rpm. Posteriormente el extracto se filtro y dializó para finalmente secarlo por liofilización durante 8 h.<sup>23</sup>

### 7.5. Caracterización enzimática de las endolevanasas.

**7.5.1 Ensayo estándar de actividad.** La actividad fue determinada a pH 6.0 en amortiguador de fosfatos 50 mM a 35°C, midiendo la velocidad inicial de liberación de poder reductor mediante la técnica de DNS<sup>31</sup> a partir de soluciones de levana microbiana al 1 % p/v en un volumen de reacción de 500 µL. Se tomaron muestras cada determinado tiempo, a las que se agregó el reactivo de DNS, calentándose a ebullición durante 5 minutos. Se enfriaron las muestras con agua corriente y se midió la absorbancia a 540 nm. Una unidad de actividad endolevanasa fue definida como la cantidad de enzima requerida para obtener un µmol de azúcar reductor equivalente a fructosa por minuto. Los productos de reacción también fueron analizados por cromatografía en capa fina, HPLC y HPAEC-PAD. Los ensayos se realizaron por duplicado

**7.5.2 Efecto de la temperatura y pH.** El efecto de la temperatura sobre la actividad de las endolevanasas fue evaluado con el ensayo de actividad estándar a pH 6.0 y a diferentes temperaturas en el rango de 20 a 80°C, mientras que el efecto del pH se determinó a la temperatura óptima con valores de pH en el rango de 4 a 8, utilizando diferentes buffers acetatos (pH 3–5.5), fosfatos (pH 5.5–7.5), Tris–HCl (pH 8–9). Las reacciones fueron preparadas de igual forma que en el ensayo de actividad estándar. Los ensayos se realizaron por duplicado

**7.5.3 Estabilidad térmica.** La estabilidad térmica de las endolevanasas fue evaluada incubando la enzima al pH óptimo y a las temperaturas de 30 y 35°C. Se tomaron muestras de 50µL de la solución de enzima cada 2 h hasta 10 h de incubación con una medición adicional a las 24 h. Se determinó la actividad residual utilizando el ensayo de actividad estándar. Los ensayos se realizaron por duplicado

**7.5.4 Propiedades cinéticas.** Se determinó el comportamiento cinético de las endolevanasas en un rango de concentración de sustrato de 10 a 150 mg/mL empleando la fracción de bajo peso molecular de la levana producida por SacB. Los ensayos se realizaron por duplicado

**7.5.5 Ensayos de producción de FOS.** Se llevaron a cabo reacciones con 50 y 100 g/L de la levana producida por SacB a 35°C y a 100 g/L a 45°C con una concentración de enzima de 1 U/mL, en volúmenes de 500 µL en y tomando muestras en intervalos de 30 min durante 5 h. La enzima se

inactivó sometiendo las muestras a una temperatura de 90°C durante 10 min. Los ensayos se realizaron por duplicado.

### 7.6.- Propiedades prebióticas

**7.6.1 Análisis de crecimiento bacteriano.** Para esta etapa se utilizaron diferentes cepas de *Bifidobacterium* y una de *Lactobacillus*: *B. bifidum*, *B. longum*, y *L. casei* evaluando su crecimiento y el descenso de pH en el medio. Las cepas fueron inoculadas primeramente para su activación en medio TPY con una concentración de fructosa de 5g/L en condiciones microaeróbicas inyectando CO<sub>2</sub> en un volumen de 25mL. Posteriormente para evaluar las propiedades prebióticas las fermentaciones fueron llevadas a cabo en condiciones microaeróbicas a 37°C inyectando CO<sub>2</sub> en un volumen de 25mL, utilizando un medio mínimo (KABEL), empleando como única fuente de carbohidratos los FOS producidos a una concentración de 5 g/L. Los cultivos se monitorearon midiendo la densidad óptica y su pH. Los ensayos se realizaron por duplicado

### 7.7 - Métodos generales de identificación y análisis de productos.

**7.7.1 Cromatografía en capa fina.** Los productos de reacción fueron analizados mediante cromatografía en capa fina utilizando como fase estacionaria placas de sílica gel 60 (MERCK) y como fase móvil una solución de etanol, butanol y agua (15:9:6) v/v. Las placas fueron eluidas dos veces y reveladas con  $\alpha$ -naftol y calor. Se utilizó como estándar Raftilosa P95 que consiste en una mezcla de FOS obtenidos de inulina.

**7.7.2 Cromatografía de permeación por gel (GPC).** El análisis de la distribución de peso molecular (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 300mm), 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.

**7.7.3 Cromatografía de intercambio iónico (HPAEC).** Para identificar y cuantificar oligosacáridos las muestras se centrifugaron, se sonicaron y se analizaron mediante cromatografía de intercambio iónico (HPAEC) en un equipo Dionex equipado con un detector electroquímico (ED50 Dionex) y utilizando una columna CarboPac PA-100 (2 x 250 mm). La columna fue equilibrada a 30°C con 150 mM de NaOH a un flujo de 0.35 mL/min y las fructanas fueron eluidas con un gradiente de acetato de sodio (5 mM de acetato de sodio por 5 minutos, 5-230 mM de acetato de sodio de 5 a 100 minutos). Se utilizó como estándar Raftilosa, glucosa, fructosa, sacarosa, kestosa, 6 kestosa, nistosa y fructosil-nistosa. Todas las mediciones se hicieron por duplicado.

**7.7.4 Cromatografía preparativa.** Por medio de un análisis por HPLC se colectaron a la salida del cromatógrafo los FOS, correspondientes de las señales con una mayor concentración, empleando una columna amino preparativa utilizando como fase móvil acetonitrilo:agua 75:25 v/v.

## 8.- Resultados y Discusión

### 8.1 Producción de levana

En esta primera parte de la sección de resultados se describe el estudio de la síntesis de la levana de *Bacillus subtilis* por la enzima levansacarasa recombinante SacB, obtenida por el método reportado por Ortiz-Soto.<sup>7</sup> El resto de las levanas fueron producidas siguiendo el protocolo descrito en el apartado de metodología

La levana producida por la levansacarasa de *B. subtilis* SacB tiene una distribución bimodal de peso molecular, con dos poblaciones cuyo peso molecular promedio es de 3500 KDa y 8.3 KDa. En las condiciones de producción de esta levana reportadas se tiene un porcentaje aproximado del 40% de la fracción de alto peso molecular y un 60% de la fracción de bajo peso molecular<sup>7</sup>, tal como se describe en la figura 11.

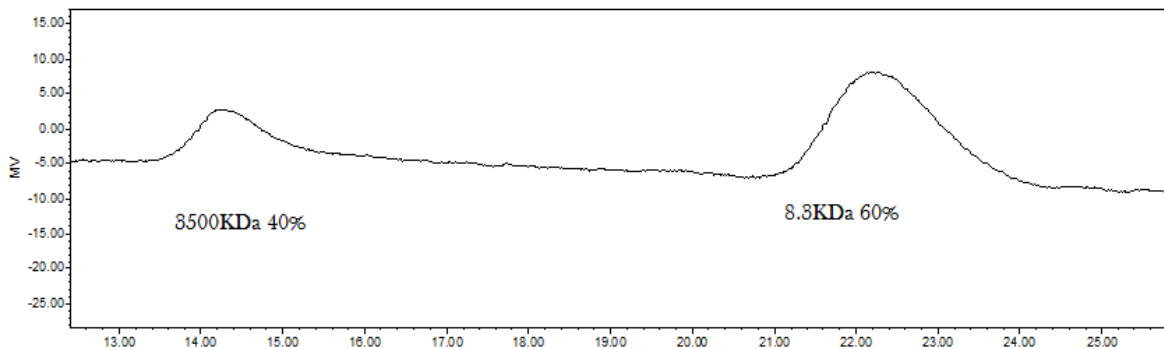


Figura 11. Distribución bimodal del peso molecular de la levana producida por SacB empleando una concentración de sustrato de 100g/L de sacarosa, 1U/mL de enzima a 35°C y pH de 6.0.

Se sabe que al aumentar la concentración de sacarosa la actividad de transferencia aumenta, disminuyendo la hidrólisis notablemente. Tanaka *et al.* (1980) encontraron que a bajas temperaturas también se ve favorecida la transferencia, mientras que Chamber *et al.* (1976) observaron que al aumentar la temperatura en el medio de reacción aumentaba la hidrólisis. Tomando en cuenta estas observaciones, se probaron concentraciones de 100 g/L a 600 g/L de sacarosa a temperaturas de 35°C y 4°C. Además, el estudio se realizó

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

empleando una concentración de enzima 5 veces mayor a la que se venía utilizando en estudios previos, con el fin de disminuir los tiempos de reacción. Para las reacciones a 35°C el tiempo de reacción fue de 24 h, mientras que a 4°C las reacciones se mantuvieron hasta por 72 h.

Se midieron las concentraciones de glucosa, fructosa y sacarosa al inicio y al final de las reacciones, utilizando como control las condiciones reportadas por Ortiz-Soto.<sup>7</sup> Para la producción de levana con esta enzima, es decir 1 U/mL de enzima 100 g/L de sacarosa (292 mM) a 35°C durante 24 h.

Tabla 2. Efecto de la concentración de sacarosa y la temperatura a 4 y 35°C en la síntesis de levana por la levansacarasa SacB de *B. subtilis* (todas las reacciones, con excepción del control, se llevaron a cabo usando una concentración de enzima de 5U/mL a un pH de 6.0. En el control se usó una concentración de enzima de 1U/mL).

Temperatura y tiempo de reacción	Sacarosa (g/L)	Sacarosa (mM)	Fructosa (mM)	Glucosa (mM)	Sacarosa consumida (%)	Transferencia (%)
<b>4°C</b>						
<b>(72 h)</b>						
	100	292	155	245	100	47
	200	585	161	445	100	72
	300	877	138	631	95	79
	400	1170	163	722	94	80
	500	1462	190	718	85	72
	600	1754	172	566	76	66
<b>Control</b>	100	292	133	239	100	54
<b>35°C</b>						
<b>(24 h)</b>						
	100	292	285	261	100	2
	200	585	448	474	100	23
	300	877	386	673	100	56
	400	1170	382	1066	97	64
	500	1462	399	1349	96	69
	600	1754	255	1156	98	83
<b>Control</b>	100	292	166	282	100	43



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La fructosa incorporada a polímero, es decir la eficiencia de la reacción de transferencia, se obtuvo de la siguiente forma:

$$T_{\%} = [(S_i - S_r - F_f) / S_i] \times 100$$

Donde  $S_i$  es la sacarosa inicial,  $S_r$  es la sacarosa residual,  $F_f$  es la fructosa libre, que corresponde a la sacarosa que fue hidrolizada cuando todo se expresa en concentración molar.

Analizando los resultados de la tabla 2 podemos concluir que al realizar la reacción a  $35^{\circ}\text{C}$  se logra una mayor eficiencia en la síntesis de levana conforme se aumenta la concentración de sustrato. Sin embargo, es claro que a menor temperatura se favorece la transferencia, aunque a bajas temperaturas hay que tomar en cuenta la disminución en la velocidad específica de reacción, lo que implica una disminución en la productividad. También puede apreciarse en la tabla 2 que a pesar de los largos tiempos de reacción, a  $4^{\circ}\text{C}$  y altas concentraciones de sustrato no se alcanza la conversión total de sacarosa y por lo tanto requeriría de mayor tiempo la reacción y la productividad de esta se vería disminuida.

Al analizar la distribución de pesos moleculares de las reacciones que dieron lugar a los resultados presentados en la tabla 2, se encontró que al aumentar 5 veces la concentración de enzima con respecto a la concentración usada en la síntesis tal como se había venido realizando, se modifica la distribución de pesos moleculares, obteniéndose una mayor proporción del polímero de bajo peso molecular que el de alto peso molecular (figura 12).

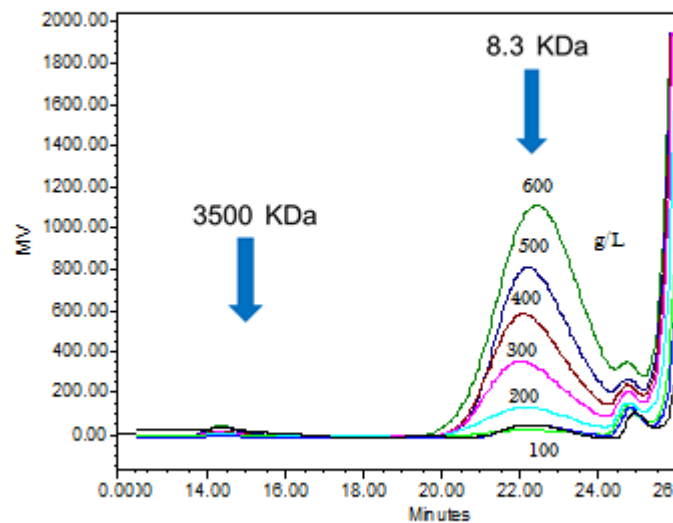


Figura 12. Distribución de peso molecular de la levana producida por la levansacarasa de SacB sintetizada a 24h a una alta concentración de enzima (5 U/mL) en función de la concentración inicial de sustrato a 35°C .

En la figura 12 se observa una distribución de pesos moleculares radicalmente diferente a la observada con anterioridad, al desaparecer la distribución bimodal y lograrse una síntesis de polímero compuesta de 99% de levana de bajo peso molecular, según se calcula a partir de la relación entre áreas relativas de integración.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Euzenat *et al.*, quienes observan una alta cantidad de polímero de bajo peso molecular al utilizar una concentración de 12 U/mL de SacB incluso llegando a observar la presencia de FOS sintetizados a partir de sacarosa utilizando estas concentraciones de enzima.<sup>35</sup> Una posible hipótesis que explicara este fenómeno es que al usar una mayor cantidad de enzima en la reacción se aumentan los núcleos de formación de polímero durante la síntesis y por lo tanto disminuye el peso molecular de las cadenas sintetizadas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para verificar esta hipótesis en otras condiciones se realizó un ensayo con una concentración baja de enzima (0.1 U/mL) a una concentración de 400 g/L de sacarosa. La reacción fue monitoreada durante 60 h cada 5 h. Cabe mencionar que dada la extremadamente baja concentración de enzima usada, no se observó un consumo total del sustrato, habiéndose alcanzado sólo un 25% a las 60 h de reacción. Al analizar los productos obtenidos por cromatografía de permeación en gel, se encontró una distribución normal de peso molecular únicamente con la fracción de alto peso molecular es decir 3500 KDa (figura 13), sin observarse productos de bajo peso molecular.

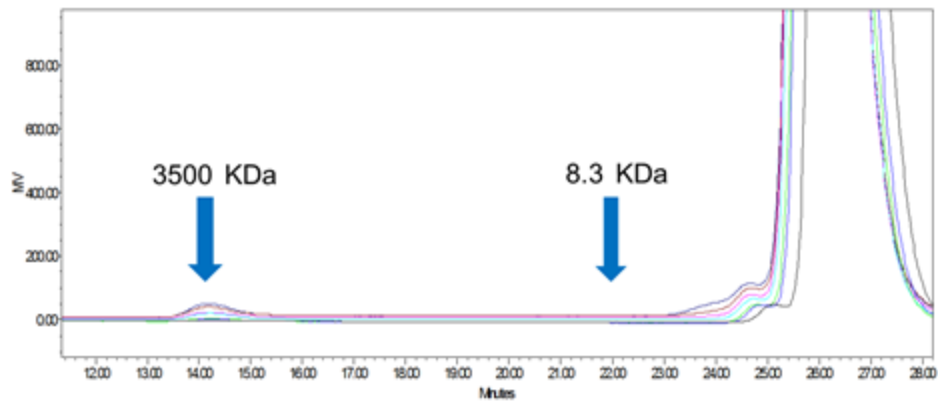


Figura 13. Distribución de peso molecular de la levana de SacB sintetizada con 0.1 U/mL de enzima con 400 g/L de sacarosa.

Si bien ya se había reportado que a altas concentraciones de enzima se podía sintetizar en mayor proporción la fracción de levana de bajo peso molecular, hasta la fecha no se había visto ni reportado que a una baja concentración de enzima podría desplazar la especificidad al otro extremo, obteniéndose sólo la fracción de alto peso molecular. En la figura 14 se observa como varía la distribución de pesos moleculares en función de la concentración de enzima, al inicio y al final de la reacción.

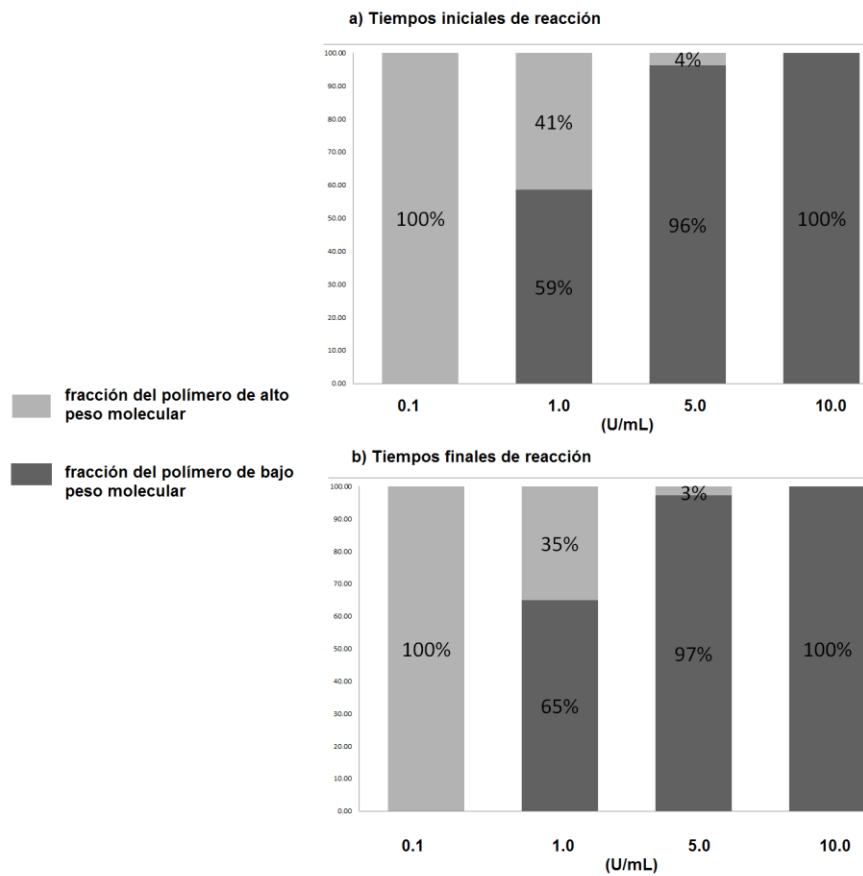


Figura 14. Distribución de peso molecular de la levana de SacB sintetizada con 0.1, 1, 5 y 10 U/mL de enzima con 400g/L de sacarosa a tiempos iniciales a) y finales b) de la reacción. A tiempos cortos de reacción 5h, a tiempos finales 24h). Para la más baja actividad los tiempos fueron de 10 y 60h respectivamente.

Como se puede apreciar, existen dos fracciones importantes de producto, una de alto y otra de bajo peso molecular: la proporción de cada fracción cambia muy poco con el tiempo. La aparición del polímero de bajo y alto peso molecular parece ser simultánea. Sin embargo la proporción que hay de cada fracción parece depender sólo de la concentración de enzima. Resulta interesante observar con estos experimentos que sólo existen dos distribuciones sin que se observarse productos de tamaño intermedio entre ambas distribuciones. Esto puede explicarse a través del mecanismo procesivo que evita la liberación de productos intermedios al medio de reacción. A este fenómeno se agrega el

efecto que de manera general se describió con anterioridad, pero que requiere aun de una explicación mecanística detallada.

El perfil de productos de una distribución bimodal de pesos molecular de levanas se ha observado únicamente con las levansacarosas provenientes de cepas de bacterias de *B. subtilis*<sup>34 y 36</sup> aunque no exactamente dentro del mismo rango de valores de pesos moleculares. Sin embargo hasta la fecha no se había reportado que esta distribución de pesos moleculares dependiera de la concentración de enzima. En ensayos hechos por Ahmed *et al.* (2005) evaluaron el comportamiento del peso molecular de una levana sintetizada por una levansacarasa de la cepa de *B. subtilis* NRC 33 en función de la concentración de enzima, si que observaran cambio alguno en la distribución de pesos moleculares. Cabe mencionar que la distribución del peso molecular de esta levana es normal, con un peso molecular promedio de alrededor de 50KDa, mientras que para la levansacarasa aislada de *B. subtilis* C4 -cuya distribución de pesos moleculares es bimodal (similar a la levansacarasa de *B. subtilis* cepa 168)- se observó el mismo comportamiento modificando el perfil de productos a altas concentraciones de enzima produciendo predominantemente la fracción de bajo peso molecular.<sup>38</sup> Parece que este comportamiento de cambio en la distribución de tamaño de productos en función de la concentración de enzima sólo se presenta en enzimas con una distribución bimodal; lo interesante en este caso es que la variación se presenta en productos de levansacarosas de la misma especie, quizás debido a variaciones dentro de cada subespecie del mecanismo de elongación de polímero, o de la afinidad por los aceptores en el proceso de elongación. Independientemente del mecanismo, el fenómeno se da bajo una combinación de condiciones de reacción tales como: alta concentración de enzima con baja concentración de sustrato; alta concentración de enzima y altas concentración de sustrato y por último baja concentración de enzima y alta concentración de sustrato. En el primer caso (tabla 2) al tener 5 U/mL de enzima y 100 g/L de sacarosa se observa una transferencia totalmente disminuida, probablemente debido a baja concentración de aceptores en la reacción lo que favorece que una vez formado el intermediario fructosil-enzima sea más fácil que se transfiera a una molécula de agua como aceptor que a una molécula de sacarosa que también están siendo usadas como donadores de grupos fructosilo, dando como resultado

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

un comportamiento casi totalmente hidrolítico. Por otro lado se observa la presencia de polímero de bajo peso molecular (8.3 KDa), solo cuando se tiene una alta concentración de sustrato, que por un lado favorece la transferencia al tener una alta concentración de sacarosa y por otro se disminuye la actividad acuosa, favoreciendo la reacción de polimerización. Sin embargo al haber muchos núcleos de formación de polímero (sitios activos de la enzima) las cadenas sintetizadas disminuirán en tamaño al distribuir los grupos fructosilo entre un mayor número de moléculas de enzima (5U/ml). La distribución es entonces diferente a la observada a concentraciones de 1 U/mL de enzima. A bajas concentraciones de enzima (1 U/ml) al haber pocos núcleos de formación de polímero se permite la elongación de este hasta llegar a pesos moleculares de alrededor de 3500 KDa.

Por otro lado existe otro antecedente con una levansacarasa de *Z. mobilis*, en el que el perfil de productos está relacionado con 2 posibles formas activas de la enzima dependientes del pH; a pH de 6.0 un dímero predomina la hidrólisis de la sacarosa y la síntesis de un trisacárido, mientras que a pH 7.0 se forman microfibrillas de enzima, y el perfil de productos es distinto, dando lugar a una levana con un peso molecular de 20 KDa.<sup>39</sup> En el caso de la levansacarasa de *B. subtilis* podría darse la misma situación: formación de dímeros u oligómeros, quizás incluso dependientes de la concentración de enzima. Así, el efecto observado en este caso sería inverso al observado con la levansacarasa de *Z. mobilis*. Sin embargo, en la estructura cristalográfica de SacB sólo se observa la enzima como monómero las condiciones de formación del cristal son diferentes a las condiciones de reacción.<sup>40</sup>

Ambas hipótesis fueron expuestas con anterioridad están aun por comprobarse. Sin embargo abren puertas a nuevas investigaciones para tratar de explicar el mecanismo por el cual se da origen a un perfil de productos distinto en función de la concentración de enzima.

Este resultado, si bien no es central dentro de los objetivos de este proyecto, resulta de sumo interés en el contexto global del proceso en desarrollo y contribuye al estudio de los factores que afectan el peso molecular de los polímeros sintetizados por las fructosiltransferasas.

Con el fin de definir las condiciones más adecuadas para la síntesis de levana de bajo peso molecular para este proyecto, se llevaron a cabo estudios cinéticos a concentraciones de 200, 400 y 600 g/L de sacarosa midiendo la concentración de glucosa, fructosa, sacarosa cada 3 horas durante un intervalo de 27 h, empleando las mejores condiciones de reacción definidas en los ensayos descritos previamente, es decir, 35°C y 5 U/mL de enzima. Estos resultados se presentan en la figura 15.

Un punto importante a señalar en estos resultados es el hecho de que se observa una mayor diferencia entre la concentración de glucosa y fructosa libres conforme más sacarosa hay en el medio; esta diferencia es un indicativo de una mayor transferencia y por ende de una menor hidrólisis. En el extremo ideal, la cantidad de fructosa deber ser cero, cuando toda la fructosa de la sacarosa se transfiere a polímero. Otro punto importante es que en los tres casos se llega a una etapa en la reacción en que se vuelve constante la concentración de sustratos y productos aunque con una concentración de sacarosa muy baja. Esto hace suponer que existe algún tipo de inhibición que impide la conversión total de la sacarosa o bien algún tipo de equilibrio cinético que sería conveniente estudiar con mayor detalle. La tabla 3 muestra un resumen de los resultados obtenidos de estos tres estudios, en donde se calculó el valor de productividad de la siguiente forma:

$$\text{Productividad} = (S_i - S_r - F_f) / t$$

Donde  $S_i$  es la sacarosa inicial,  $S_r$  es la sacarosa residual,  $F_f$  es la fructosa libre, que corresponde a la sacarosa que fue hidrolizada cuando todo se expresa en concentración molar y  $t$  es el tiempo al cual ya no se observó variación en la concentración de sacarosa

En estos resultados la transferencia juega un papel importante en los valores de productividad, ya que a pesar de llegar al final de la reacción en un menor tiempo en reacciones con una baja concentración de sacarosa (200 y 400 g/L) la transferencia es

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

menor que a 600g/L, mientras que a concentraciones altas la transferencia se ve favorecida y una mayor parte de la sacarosa que reacciona se incorpora al polímero.

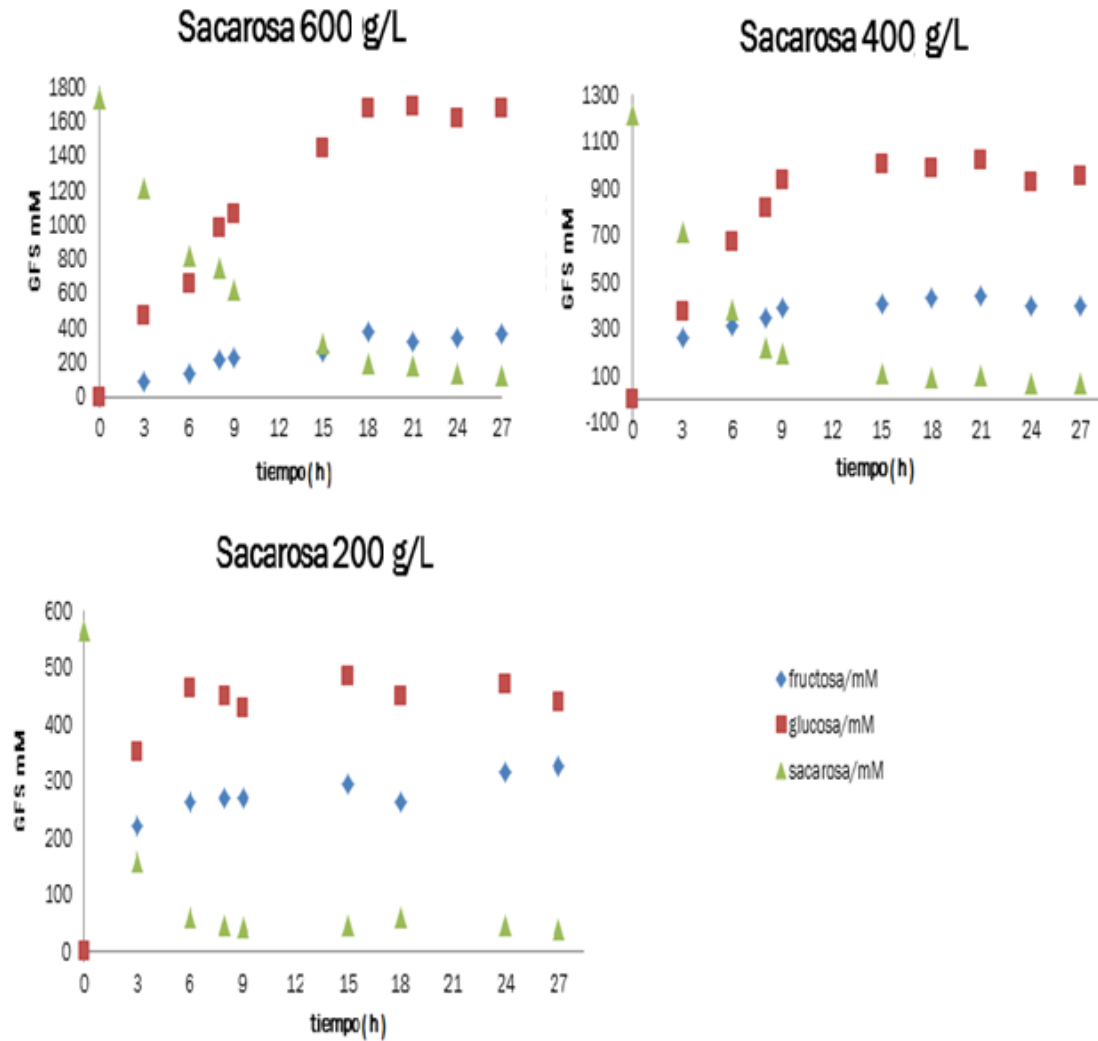


Figura 15. Evolución de la reacción de síntesis de levana de bajo peso molecular a diferentes concentraciones de sacarosa (5 U/mL de enzima y a 35°C)



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con base a estos resultados se seleccionó la condición más adecuada para producir la fracción de bajo peso molecular de la levana producida por SacB, que fue de 600g/L obteniéndose los mejores resultados en cuanto a transferencia y productividad.

Tabla 3. Resultados de la síntesis de levana de SacB a diferentes concentraciones de sustrato a 35°C.

Sacarosa (g/L)	Sacarosa (mM)	tiempo final (h)	%sacarosa consumida	%transferencia	Productividad (mM/h)
200	584	9	90	33	19
400	1169	18	90	61	35
600	1754	24	90	78	51

## 8.2 Aislamiento de los genes de las endolevanasas de *B. licheniformis* y *B. subtilis*.

Se logró amplificar los genes de las endolevanasas LevBs y LevBl a partir del ADN genómico de las cepas de *B. subtilis* cepa168. y *B. licheniformis* respectivamente, mediante PCR empleando los oligonucleótidos y las condiciones indicadas en el apartado de metodología. Una vez amplificados los genes de ambas endolevanasas, se elaboró un gel de agarosa para observar que efectivamente se había logrado amplificar estos genes, obteniéndose ambos del tamaño esperado 1.5 Kpb.

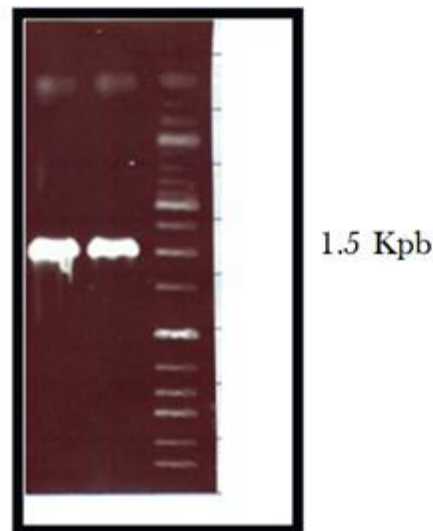


Figura 16. Gel de agarosa de los genes de las endolevanasas LevBs y LevBl aislados de las cepas de *B. subtilis* cepa 168. y *B. licheniformis*.

Para ambos genes, los oligonucleótidos fueron diseñados omitiendo el péptido señal predicho por SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>), eliminando así

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

cerca de 90 pb y obteniéndose finalmente ambos genes con un tamaño de alrededor 1500 pb como se observa en la figura 16.

Los genes aislados fueron clonados en el vector pet22-b(+) (figura 17), en la región localizada entre los sitios de restricción NcoI y XhoI, para posteriormente obtener la proteína con la región del péptido señal propia del vector y la etiqueta de histidinas.

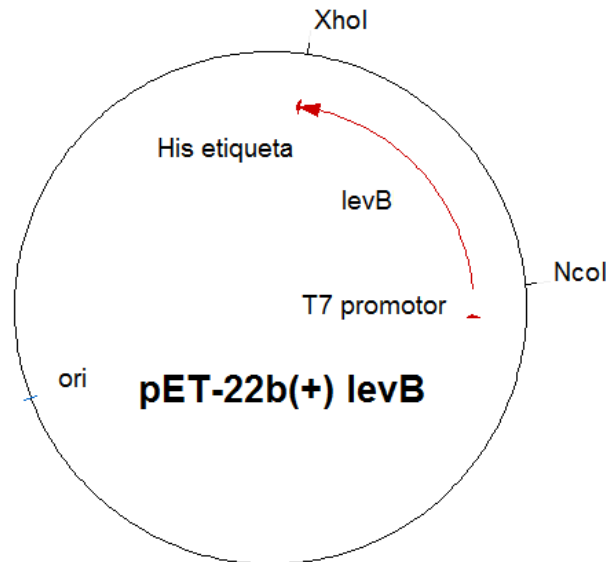


Figura 17. Mapa de restricción del vector pet22-b(+).

Para comprobar la clonación de ambos genes en el vector, se realizó una digestión de la construcción con las enzimas NcoI y XhoI y se analizó en un gel de agarosa.

En la figura 18 se puede observar que los genes fueron clonados exitosamente en el vector de expresión pet22-b(+). Los genes clonados fueron secuenciados para confirmar que efectivamente se trataba de los genes de las endolevanasas. La secuencia de la enzima LevBs coincide en un 100% con la reportada en el banco de datos de NCBI, mientras que para la enzima LevBl proveniente de una cepa desconocida de *B. licheniformis* se encontró que poseía una identidad del 99% con la endolevanasa hipotética de la cepa de *B. licheniformis* SVD1 y una identidad el 94% con la endolevanasa hipotética de la cepa de

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*B. licheniformis* ATCC 14580, secuencia a partir de la cual se habían diseñados los oligonucleótidos para aislar el gen.

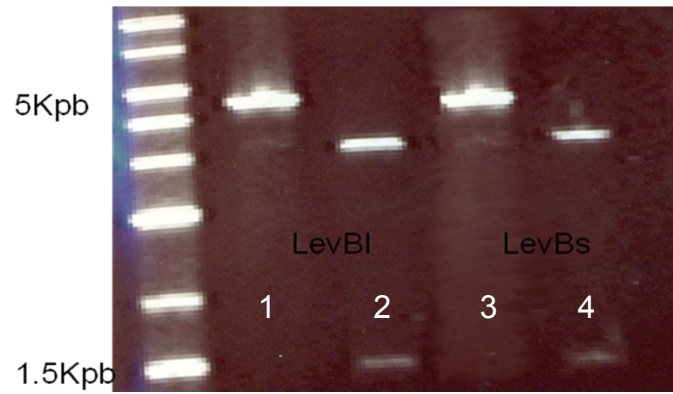


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa de los genes de las enzimas LevBI y LevBs. 1) pet22-b(+) + levBI, 2) pet22-b(+) + levBI después de la digestión 3) pet22-b(+) + levBs 4) 2) pet22-b(+) + levBs después de la digestión

### 8.3 Expresión de las proteínas recombinantes en un sistema heterólogo LevBs y LevBl.

Empleando los vectores con los genes clonados, se transformaron las cepas de *E. coli* Origami D3, C43, BL21 codon plus y Rosseta 2. Se encontró que en las cepas BL21 codon plus y Rosseta 2 se produjo una sobreexpresión de las enzimas probablemente debido a que estos dos tipos de cepas poseen 4 y 7 RNAs de transferencia extras para codones raros respectivamente. Como se observa en la figura 19, ambas enzimas se sobreexpresan en este sistema y se encuentran mayoritariamente en la fracción soluble. En la misma figura las bandas más intensas corresponden a proteínas con peso molecular de 60 y 50 KDa seguramente correspondientes a las endolevanasas que tienen un peso aproximado de 56 KDa. Por otro lado, en las cepas Origami D3 y C43 no hubo una expresión importante. Finalmente en la cepa Rosseta 2 se observó una concentración de proteína casi 7 veces mayor que en la cepa BL21 codon plus, por lo que se seleccionó la primera para llevar a cabo la expresión de las proteínas recombinantes.

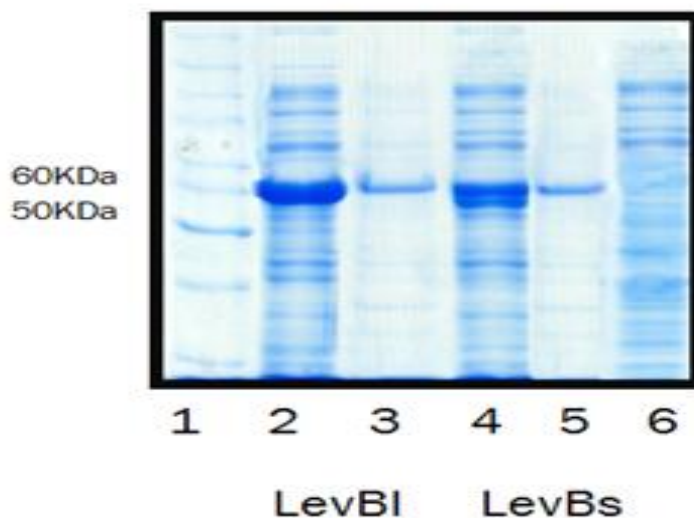


Figura 19. SDS-PAGE de las endolevanasas LevBI y LevBs expresadas en *Escherichia coli* Rosseta 2. 1) Marcador de peso molecular, 2) LevBI sobrenadante 3) LevBI pellet, 4) LevBs sobrenadante 5) LevBs pellet. 6) Extracto de cepa transformada sin inserto.

Con el fin de confirmar que las bandas de sobreexpresión corresponden a las endolevanasas se realizó un ensayo de inmunodetección utilizando anticuerpos contra la etiqueta de histidinas fusionada a ambas enzimas.

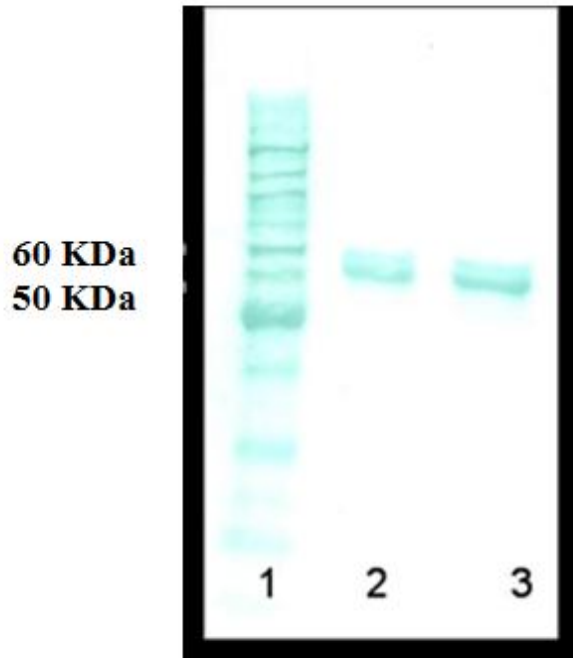


Figura 20. Ensayo de inmunodetección de las endolevanasas LevBI y LevBs expresadas en *E. coli* Rosseta 2 empleando un anticuerpo anti(His)<sub>n</sub>. 1) Marcador de peso molecular, 2) LevBI 3) LevBs

Como se observa en la figura 20, las proteínas detectadas por este ensayo corresponden al peso molecular de 56 KDa, que es el correspondiente de las dos enzimas clonadas.

Posteriormente se llevó a cabo un ensayo cualitativo de actividad, utilizando la técnica para medir azúcares reductores que emplea como reactivo al ácido 3,5 dinitrosalicílico

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

(DNS) de color amarillo que al reducirse a 3-amino-5-nitrosalicílico en presencia de un azúcar reductor se torna rojo (figura 21).

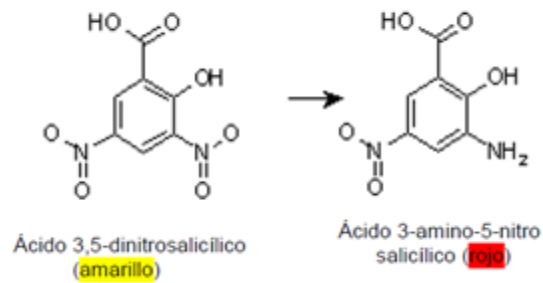


Figura 21. Estructura del DNS y ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, base del ensayo de actividad de la endolevanasa.

El ensayo se realizó con una concentración de 10 g/L de fructanas de diversos orígenes, empleando 50  $\mu$ L de cada extracto enzimático. Las reacciones se llevaron a cabo durante 3 horas y se detuvieron al agregar el reactivo del DNS: una coloración rojiza indica que la prueba es positiva, es decir que los sustratos fueron hidrolizados aumentando así los extremos reductores.

Tabla 4. Actividad de las endolevanasas LevBI y LevBs sobre fructanas de diversos orígenes realizando un ensayo cualitativo mediante la reacción de DNS.

Sustrato	Actividad LevBI	Actividad LevBs
Sacarosa	negativa	negativa
Levana <i>B. subtilis</i> str. 168	positiva	positiva
Levana <i>L. mesenteroides</i> NRRLB-512F	positiva	positiva
Levana <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293	positiva	positiva
Inulina Orafti	negativa	negativa
Agavina	negativa	negativa

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se puede observar en la tabla 4, ambas enzimas son capaces de hidrolizar enlaces  $\beta(2-6)$  entre dos moléculas de fructosa en la levana, más no en la agavina que también los contiene. Las enzimas tampoco muestran actividad ni hacia la sacarosa ni hacia los enlaces  $\beta(2-1)$  de la inulina. Pudiendo concluirse que son altamente específicas hacia los enlaces  $\beta(2-6)$ . Estos resultados concuerdan con lo reportado para enzimas del tipo endoinulinasas que sólo son capaces de hidrolizar moléculas de inulina, no así las exoinulinasas que pueden hidrolizar inulina, levana y sacarosa.<sup>31</sup>

Con el fin de verificar si efectivamente se trataba de enzimas con actividad tipo endo, se tomaron muestras de las reacciones de hidrólisis de la levana producida por la enzima SacB de *B. subtilis* y se analizaron por cromatografía de capa fina para verificar la presencia de fructo-oligosacáridos (figura 22).

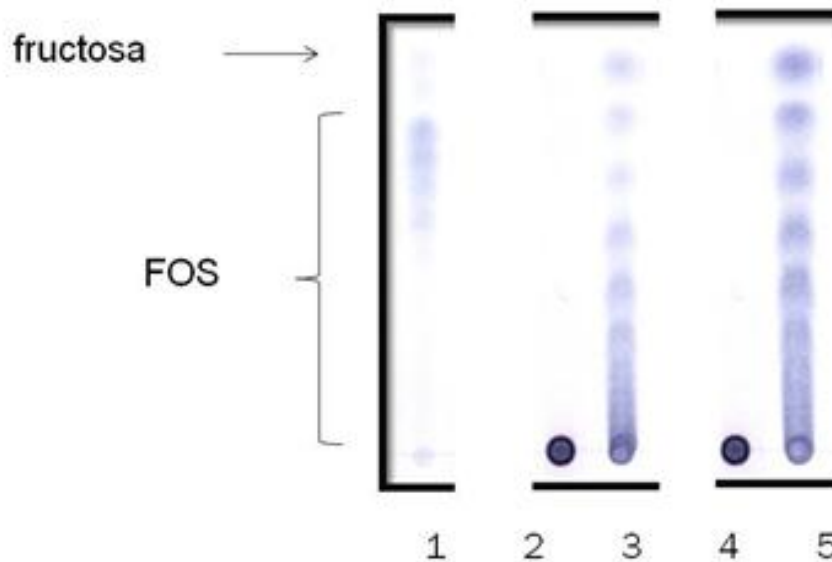


Figura 22. Cromatografía en capa fina de la hidrólisis enzimática de la levana de *B. subtilis* empleando LevBI y LevBs. 1) estándar de rafilosa, 2) hidrolizado con LevBI tiempo cero 3) hidrolizado con LevBs a 3h de reacción 4) hidrolizado con LevBI tiempo cero 5) hidrolizado con LevBI a 3 h de reacción.

En la cromatografía en capa fina que se muestra en la figura 24, se puede observar en el carril número 1 un estándar de rafilosa que es un hidrolizado comercial de inulina que



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

contiene FOS con un DP de 1 a 8. En los carriles 2 y 4 se observan las muestras correspondientes a los tiempos iniciales (cero) de las reacciones de hidrólisis, mientras que en los carriles 3 y 5 se muestran los productos de hidrólisis de las reacciones enzimáticas empleando LevBl y LevBs respectivamente después de 3 horas de reacción. En estos dos últimos carriles se puede observar claramente la presencia de FOS.

Posteriormente, se cuantificó la actividad enzimática de cada uno de los extractos producidos en cultivos con las cepas recombinantes, en términos de las unidades de actividad definidas en Materiales y Métodos. Estos extractos se obtienen de las bacterias transformadas con los plásmidos conteniendo los genes de las enzimas LevBl y LevBs, crecidas como se describe en la sección de Materiales y Métodos, lisadas y centrifugadas.

Para el ensayo de actividad se utilizó una concentración al 10 g/L de levana de *B. subtilis* a una temperatura de 30°C y un pH 6.0 utilizando buffer de fosfatos 50 mM en ensayos de un volumen de 500 µL.

Los resultados se muestran en la tabla 5, en la que se puede observar los resultados de expresión de proteína, actividad volumétrica y actividad por miligramo de proteína para ambas endolevanasas.

Tabla 5. Actividad enzimática obtenida en extractos celulares de cultivos de la cepa Rosseta 2 de *E. coli* conteniendo el gen de LevBl y LevBs.

<b>Enzima</b>	<b>Concentración de proteína (mg/mL)</b>	<b>Actividad volumétrica U/mL</b>	<b>U/mg de proteína</b>	<b>U/L de fermentación</b>
<b>LevBl</b>	17.4	9.7	0.56	584
<b>LevBs</b>	9.5	5.3	0.56	322

### 8.4 Caracterización de LevBl y LevBs.

Dentro de los requisitos para contar con un proceso eficiente de producción de FOS, además de aquellos inherentes a las propiedades cinéticas y fisicoquímicas de las enzimas, uno de los más importantes se refiere a la necesidad de lograr una alta concentración de FOS y una baja concentración de fructosa. Así, para cuantificar y comparar la eficiencia y especificidad de las dos enzimas producidas se tomaron en cuenta 3 factores: la concentración de fructosa liberada, la relación de azúcares reductores/fructosa y el consumo de sustrato. Con el fin de seleccionar una sola enzima para continuar con este proyecto se llevó a cabo un estudio cinético midiendo cada 2 horas la concentración de fructosa por HPAEC-PAD, reductores por DNS y desaparición de sustrato al final de la reacción por GPC. Se empleó como sustrato la levana producida por la enzima LevS de *L. mesenteroides B512* ya que se trata de levana con una distribución normal de peso molecular con un tamaño promedio de 2200 KDa.

Para los ensayos con ambas enzimas se usó la misma actividad enzimática en términos de unidades (0.4 U/mL), la misma concentración de levana de 10 g/L, a una temperatura de 30°C y a un pH de 6.0. Se analizaron los productos de la reacción a las 2, 4, 6 y 8 horas de reacción cuantificando la concentración de fructosa y la cantidad de azúcares reductores expresados como *equivalentes* fructosa. Los resultados se muestran en la tabla 6 y en la figura 25.

Tabla 6. Evolución de la reacción de hidrólisis de levana comparativa empleando las enzimas LevBs y LevBl, bajo las mismas condiciones de reacción.

Tiempo (h)	Fructosa (mM)	Fructosa (mM)	Reductores (mM)	Reductores (mM)	Reductores/fructosa	Reductores/fructosa
	<i>LevBs</i>	<i>LevBl</i>	<i>LevBs</i>	<i>LevBl</i>	<i>LevBs</i>	<i>LevBl</i>
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	1.79	0.16	13.48	3.40	7.54	21.24
4	4.85	0.37	17.02	5.78	3.51	15.69
6	5.36	0.64	20.59	9.07	3.84	14.14
8	5.98	0.75	24.23	9.81	4.16	13.14

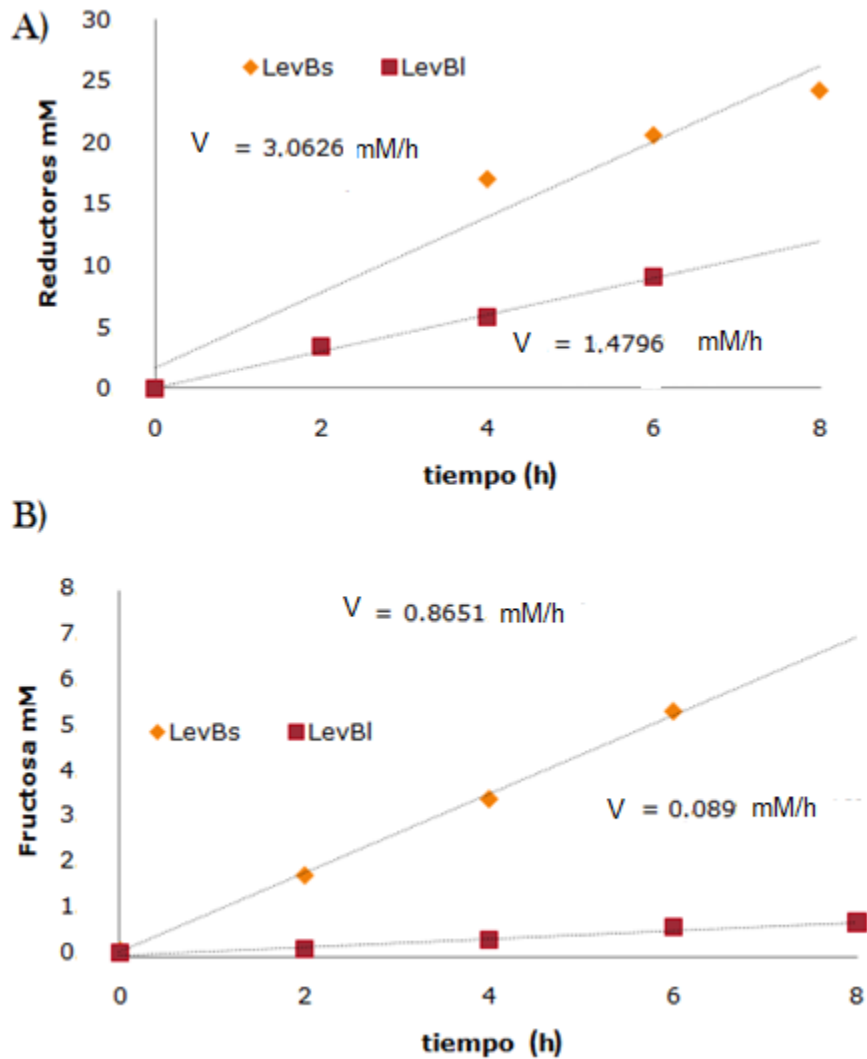


Figura 23. Evolución de la hidrólisis enzimática de la levana de *L. mesenteroides* empleando LevBs y LevBI en términos de la producción de azúcares reductores (A) y de fructosa (B).

En la figura 23 A se presenta el comportamiento cinético medido como la liberación de poder reductor generado por para ambas enzimas a partir de levana, en donde se observa

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

claramente que la enzima LevBs es casi dos veces más rápida en la liberación de poder reductor que LevBl; sin embargo, al analizar las velocidad de producción de fructosa para ambas enzimas (Fig 23 B), la velocidad de producción de fructosa de LevBs es 9.7 veces mayor que LevBl, es decir que el poder reductor que libera la enzima LevBs proviene preferentemente de la fructosa liberada. Esta relación (reductores/fructosa) se reporta en la tabla 4 y corresponde a un cociente que se hace más grande cuanto la mayor es la aportación de los FOS al poder reductor, haciéndose igual a 1 cuando la solución sólo contiene fructosa. En la tabla 6 puede apreciarse que los valores más altos de este cociente fueron obtenidos con la enzima LevBl, es decir el poder reductor liberado por LevBl proviene principalmente de FOS y produce menos fructosa que LevBs.

Por otro lado, el perfil de productos que se observa en el análisis por HPAEC-PAD revela que la hidrólisis con ambas enzimas presenta el mismo perfil de FOS, con la única diferencia, ya señalada, que la señal correspondiente a la fructosa es menor en la hidrólisis enzimática utilizando la endolevanasa LevBl.

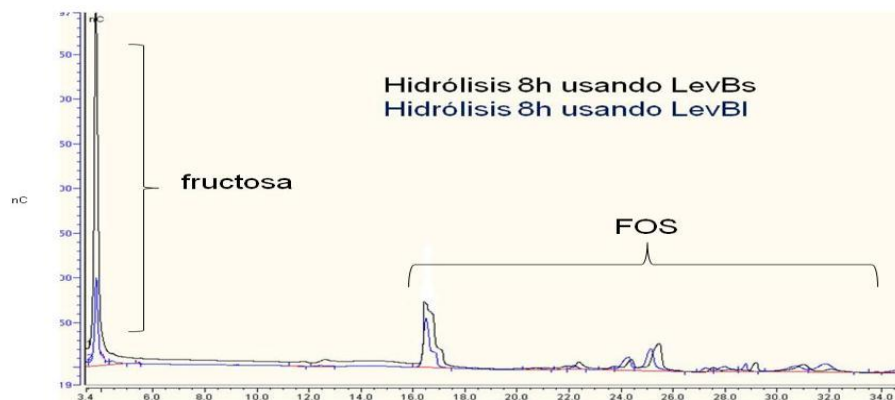


Figura 24. Cromatograma de la HPAEC-PAD de los productos de hidrólisis de la levana de *L. mesenteroides* a 8 horas de reacción, obtenidos con la endolevanasa de LevBs (negro) y de LevBl (azul).

Mediante esta técnica cromatográfica se puede observar también la evolución en el perfil de productos de hidrólisis a través del tiempo (figura 25). Dicho perfil muestra claramente

la aparición preferencial de determinados FOS, y sus cambios conforme aumenta el grado de hidrólisis.

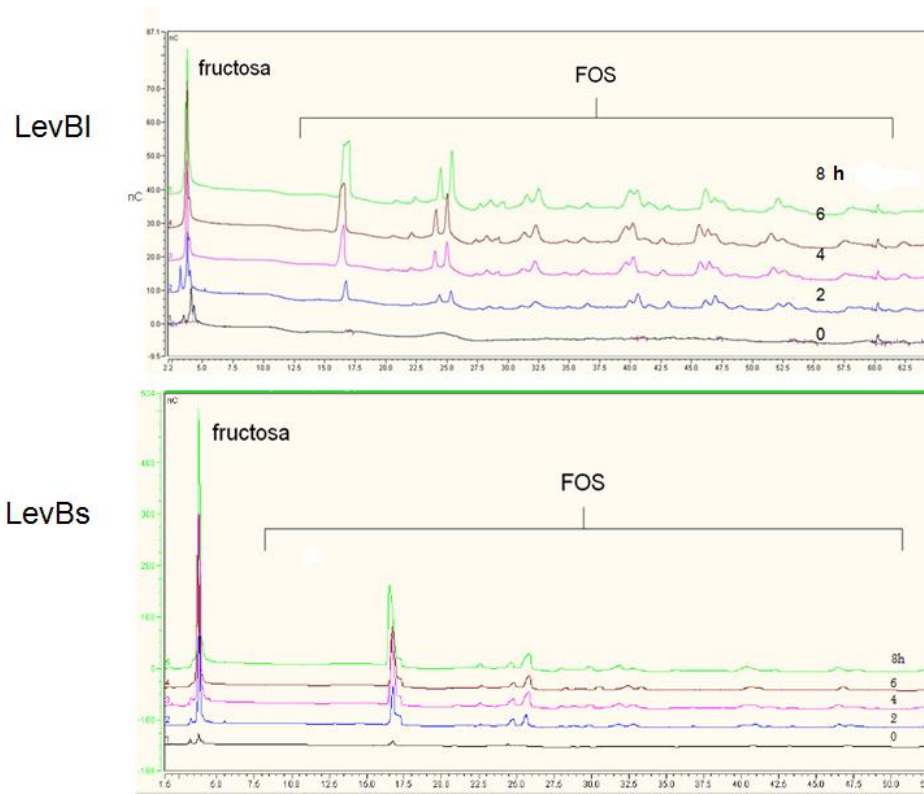


Figura 25. Evolución de los productos de hidrólisis de la levana de *L. mesenteroides* B512 durante 0, 2, 4, 6 y 8 horas de reacción. Empleando la enzima LevBI y LevBs analizados mediante HPAEC-PAD

Como conclusión, se seleccionó la enzima LevBI para continuar el trabajo, dada su especificidad para producir FOS.

## 8.5 Producción de FOS mediante la enzima LevB1.

### 8.5.1 Purificación de la enzima LevB1

Para llevar a cabo una caracterización enzimática de la enzima LevB1 se purificó utilizando las propiedades que le confiere el extremo C-terminal donde cuenta con una cola de histidinas. Esta purificación se realizó por medio de una cromatografía de afinidad por níquel, encontrándose que eluye a una concentración de 0.18 M de imidazol a un pH de 6.5. En la figura 26 se observa un gel de poliacrilamida en el que se muestran las fracciones de proteína residual a través de las diversas etapas de purificación, hasta obtener la enzima pura después de la cromatografía de afinidad.



Figura 26. SDS-page de las proteínas durante el proceso de purificación de LevB1 expresada en *E.coli*

De igual forma, se cuantificó la actividad enzimática en la fracción pura, empleando la levana producida por SacB de *B. subtilis*, llegándose a la conclusión de un incremento en la actividad específica de 3.4 veces. La enzima parcialmente purificada se observa en el carril 4 de la figura 26.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 7. Balance global de actividad en el proceso de purificación de la enzima LevBI expresada en *E.coli* a partir de un volumen de cultivo de 1 L del cual se obtuvo un volumen de 40 mL de extracto enzimático

	Volumen del extracto enzimático (mL)	Concentración de proteína (mg/mL)	Actividad volumétrica (U/mL)	Actividad específica (U/mg)	Actividad total (U)
<b>Extracto enzimático</b>	40	12.56	9.5	0.75	380 (100%)
<b>Fracción en columna Ni</b>	40	1.89	4.9	2.58	195 (51%)

### 8.5.2 Caracterización bioquímica de LevBI

Una vez obtenida la enzima pura se determinaron las condiciones óptimas de pH y temperatura de reacción, con los resultados que se muestran en las figuras 27 y 28.

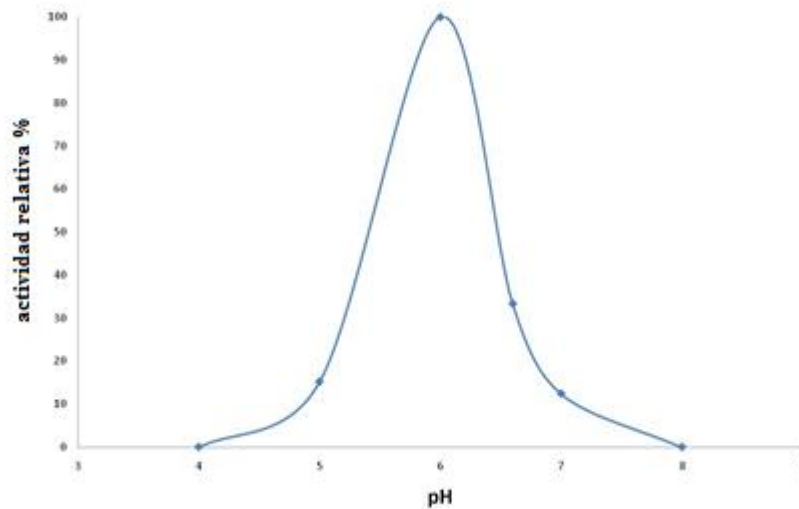


Figura 27. Efecto del pH en la actividad de la endolevanasa de LevBI. Las condiciones de reacción fueron 30°C una concentración de levana de SacB de 10 g/L con un volumen de reacción de 500  $\mu$ L.

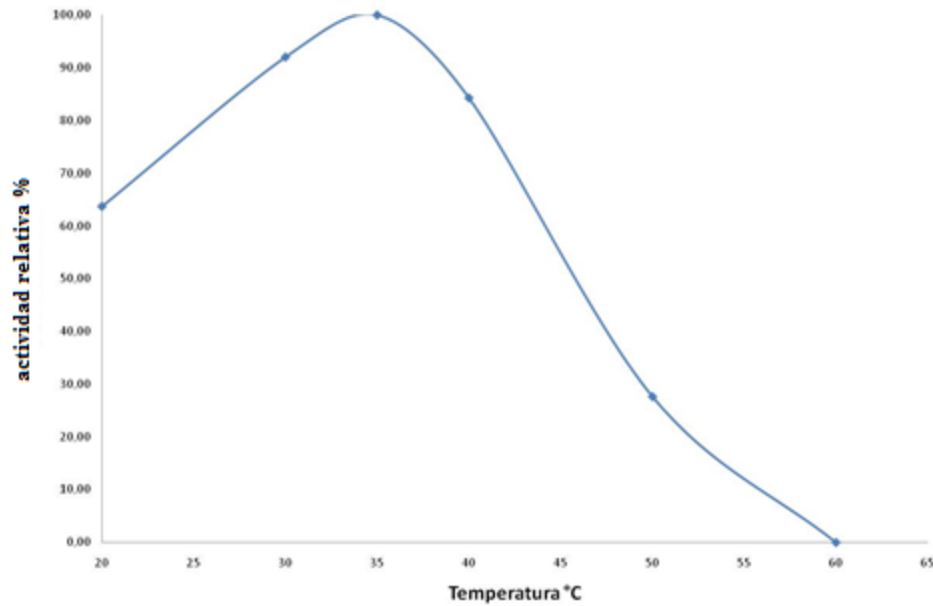


Figura 28. Efecto de la Temperatura en la actividad de la endolevanasa de LevBl. Las condiciones de reacción fueron a un pH de 6.0 a una concentración de levana de SacB de 10 g/L con un volumen de reacción de 500  $\mu$ L

Como se puede observar en la figura 27 el pH óptimo de la enzima es de 6.0, que corresponde al pH con el que se estaban llevando a cabo todas las reacciones previas a la caracterización, y que se encuentra dentro del rango de pHs óptimos que se han reportado para otras enzimas de la misma familia<sup>3, 23, 24 y 27</sup>. Miasnikov *et al.* reportaron una endolevanasa aislada de una cepa de *Bacillus sp.* en el que el pH óptimo se encuentra entre 6.2-6.6 resultados semejantes a los obtenidos con LevBl. Por otro lado, en la figura 28 se puede observar que la temperatura óptima de LevBl es de 35°C, tomando en cuenta que la enzima proviene de un microorganismo mesófilo el dato es congruente. Posteriormente se realizó un ensayo de estabilidad térmica incubando la enzima a 30°C que es la temperatura a la que se había estado trabajando con anterioridad y a 35°C que es la temperatura óptima que se encontró. En ambos casos se demostró que la enzima es estable al mantener la actividad al 100% después de incubarse a ambas temperaturas durante 24 h (no se muestran los resultados).



8.5.3 Caracterización cinética de LevBl

La caracterización cinética de la enzima se llevó a cabo en un inicio con la levana producida por la enzima SacB de *B. subtilis*, pero dada la baja solubilidad y alta viscosidad producida por la levana de alto peso molecular no se observa un comportamiento cinético claro. De hecho, existen antecedentes, con enzimas pertenecientes a la misma familia de enzimas, que dado el alto peso molecular de este sustrato, el comportamiento se hace de primer orden al no poder prepararse reacciones con concentraciones molares saturantes del sustrato.<sup>23</sup> Por esta razón se empleó la fracción de bajo peso molecular de la levana producida por la enzima SacB de *B. subtilis* con un peso molecular de 8.3KDa. De esta manera fue posible trabajar a altas concentraciones molares de sustrato sin tener problemas de viscosidad y solubilidad. Estos resultados se muestran en la figura 29 en la que la concentración se presenta en masa pues el peso molecular es el promedio de una distribución.

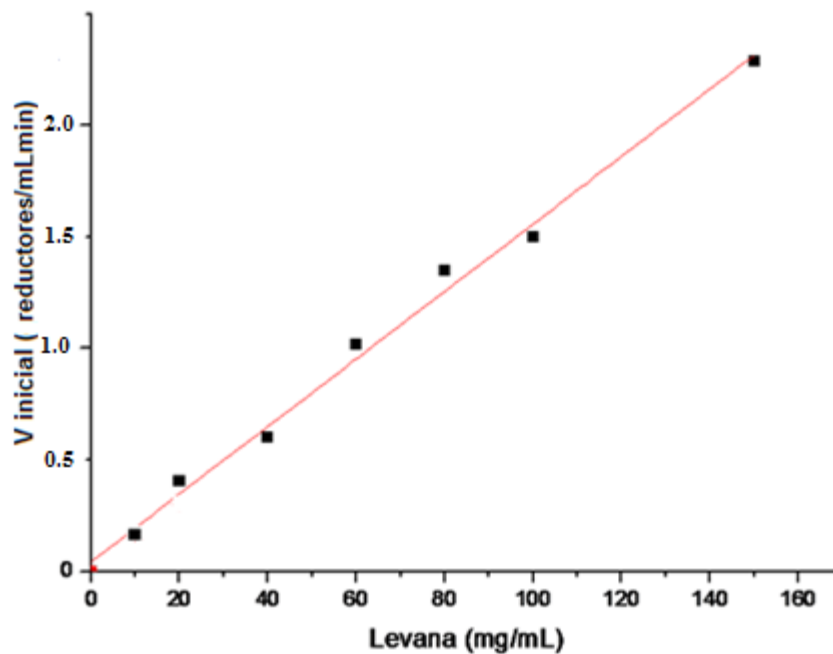


Figura 29. Estudio cinético de LevBl empleando la levana de bajo peso molecular producida por SacB

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se señaló con anterioridad, al realizar la caracterización cinética a diferentes concentraciones de sustrato empleando la levana de bajo peso molecular, se observó un comportamiento lineal de primer orden, es decir, los puntos experimentales caen en un intervalo lineal de primer orden. Esta región podría ser equivalente a la de una cinética Michaeliana en que la concentración de sustrato está muy por debajo de la saturación y en valores menores a la  $K_m$ .

### 8.5.4 Evaluación de LevB1 empleando diferentes sustratos

Se llevó a cabo un estudio de especificidad mediante un análisis comparativo, empleando 4 levanas de diferentes orígenes, a pH 6, 30°C y 0.5 U/mL de enzima. Para definir las condiciones de este experimento en lo que a concentración de sustrato se refiere, se partió de la observación de que las levanas son todas solubles a una concentración de 20 g/L. Las reacciones se llevaron a cabo durante 16 horas, midiéndose azúcares reductores por DNS analizando los productos de la reacción mediante las técnicas de TLC, HPAEC-PAD y GPC.



Figura 30. Perfil de productos observado mediante TLC empleando levanas de diversas fuentes después de hidrolizar. Estándar de raftilosa, hidrolizados de 1) Levana de SacB distribución bimodal 2) Levana de SacB fracción de bajo peso molecular 3) Levana de LevC 4) Levana de LevS

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Puede constatar que el perfil de productos en la placa de cromatografía en capa fina, no se muestra diferencias entre los productos obtenidos de la hidrólisis de las cuatro levanas bacterianas analizadas, observándose el mismo patrón en los 4 casos (figura 30).

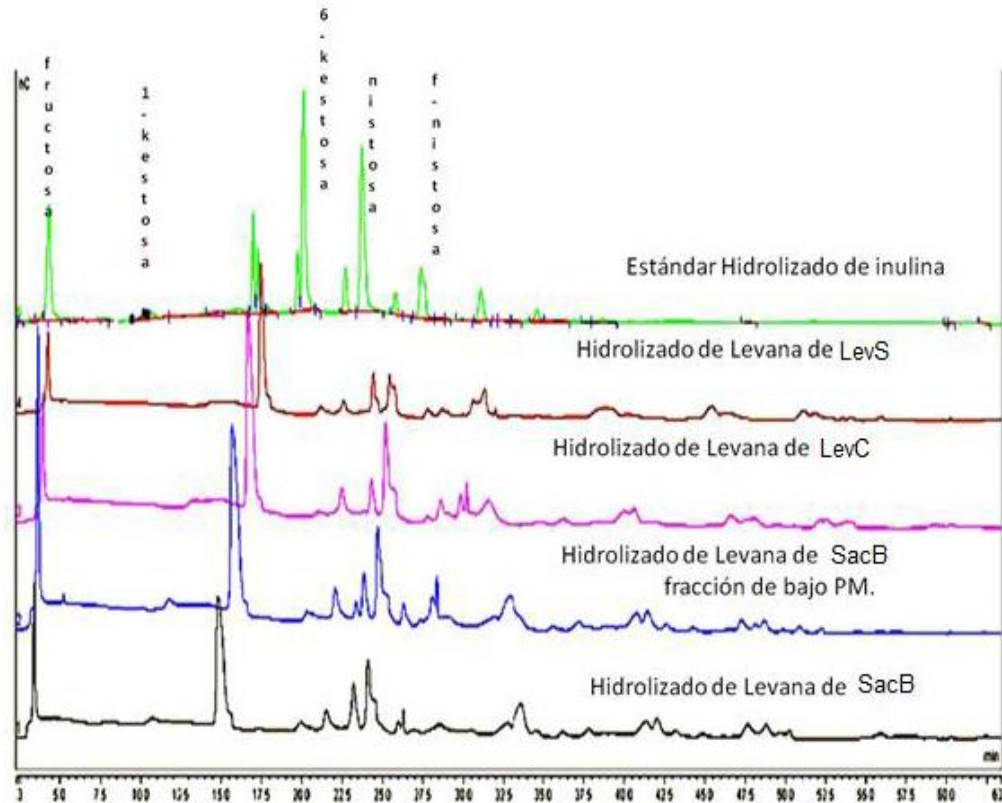


Figura 31. Cromatograma obtenido de la HPAEC-PAD de la hidrólisis 4 tipos diferentes de levanas a 16 horas de reacción.

El efecto del origen de la levana en la distribución de productos de acción de la endolevanasa se estudió con más detalle mediante el análisis de los perfiles de producto por HPAEC-PAD. En la figura 31, se muestran cromatogramas comparativos en los que se observa el mismo perfil de FOS empleando las dos levanas de *B. subtilis*. Para el caso de la levana de LevC tampoco se observan diferencias con los dos anteriores, mientras que con la levana de LevS el área de los picos fue menor en comparación con el resto de las levanas. Un pico predominante en todos los casos es la correspondiente a un producto que eluye entre la 1-kestosa y 6-kestosa, que, dada su ubicación, probablemente corresponda a un trisacárido de fructosa con enlaces del tipo levana. Por otro lado el análisis por GPC reveló la desaparición total de las 4 levanas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al medir y comparar la actividad específica de LevBI con respecto a cada una de las levanas no se observaron diferencias significativas, con excepción de la levana producida por la enzima LevS de *L. mesenteroides* B512, para la actividad específica es casi 10 veces menor que la actividad observada con el resto de las levanas (tabla 8). Este comportamiento puede deberse a que la estructura de la levana de LevS tiene un mayor número de ramificaciones. Resultados obtenidos en colaboración con el Dr. Leen de Leenheer de la Compañía de Orafti (tabla 9), demostraron mediante un análisis de cromatografía de gases acoplado a masas, que la levana producida por LevS posee un grado de ramificación mayor que la levana producida por SacB.

Tabla 8. Análisis de la actividad específica de la endolevanasa LevBI con respecto a cuatro diferentes levanas obtenidas de diversas fuentes. La actividad fue medida con cada levana a una concentración de 10g/L a una temperatura de 35°C y aun un pH de 6.0.

Levana	PM KDa	Actividad específica U/mg	Actividad relativa %
SacB	3500 y 8.3	1.80	100
SacB	8.3	1.86	100
LevC	3000	1.84	100
LevS	2200	0.15	8

Tabla 9. Comparación estructural de la levana producida por LevS y SacB

	% Levana SacB 3500 y 8.3KDa	% Levana LevS 2200KDa
Glucosas terminales	14.4	1.3
Fructosas terminales	15.1	15.7
Fructosas con 2 enlaces $\beta(2-6)$	39.6	58
Fructosas con 2 enlaces $\beta(2-1)$	20.1	0.8
Fructosas con triples enlaces	10.7	17.3

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 9 se presenta un análisis estructural comparativo de las levanas de SacB y LevS. Se observa que la levana producida por LevS contiene una mayor proporción de fructosas triplemente enlazadas que la levana producida por SacB. Las fructosas con 3 enlaces glicosídicos dentro de la cadena de levana, son las que corresponden a las ramificaciones. Otro punto importante a destacar de este análisis es que las ramificaciones en una molécula de levana deben de ser del tipo  $\beta(2-1)$ . A la menor velocidad de reacción observada para LevS puede explicarse simplemente por el mayor porcentaje de ramificación. Es igualmente sorprendente que existan unas 10 veces más glucosas en la levana de SacB que en la levana de LevS, lo que estaría relacionado con un tamaño de cadenas 10 veces menor para SacB, lo cual podría ser el caso considerando que existe una fracción de tamaño similar a LevS (3500 KDa y 2200 KDa) pero otra fracción 400 veces más pequeña (8.3 KDa).

8.5.5 Producción de FOS

Empleando una concentración de enzima de 1 U/mL y una concentración de sustrato de 50 g/L y 100 g/L de la levana de SacB, se realizó un estudio cinético a las condiciones óptimas de actividad de LevBl (pH 6.0 y a 35°C), por un periodo de 5 horas analizando el avance de la reacción cada 30min. Las muestras fueron analizadas midiendo reductores por DNS, levana residual por GPC y fructosa liberada por HPAEC-PAD. Adicionalmente, con el fin de cuantificar la fructosa que compone únicamente a los FOS, se llevó a cabo la hidrólisis total a fructosa de los productos utilizando una concentración de enzima de 15 U/mL a pH 6.0 40°C durante 6 horas de reacción. Para esto se empleó la enzima comercial Fructozyme L de Novozyme, que está constituida por una mezcla de 10 % de la endoinulinasa de *Aspergillus niger* y 90% de la exoinulinasa de *B. stearothermophilus*, siendo esta última enzima capaz de degradar la fructanas tanto  $\beta$  (2-1) como  $\beta$  (2-6) hasta unidades de fructosa.<sup>33</sup> Un ejemplo de este proceso analítico se muestra en la figura 32. La cantidad de FOS en las muestras, Ffos (fructosa en FOS), obtenidas de la hidrólisis con endolevanasa se calculó simplemente al restar la fructosa total (Ft) después de la acción de fructozyme de la fructosa (Fo) antes de este proceso.

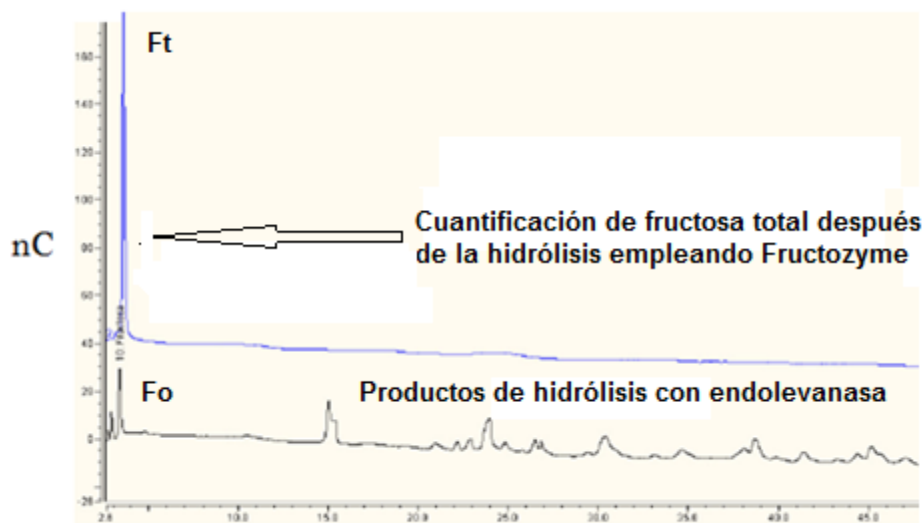


Figura 32. Cuantificación de FOS mediante la hidrólisis de la mezcla final de FOS hasta fructosa empleando las enzimas comerciales Fructozyme L. Determinación de productos por cromatografía

Se encontró que al emplear concentraciones de 50 y 100 g/L de levana original de SacB, se cumplió con el requisito antes señalado, ya que en ambos casos la levana fue consumida en su totalidad a los 30 min de reacción con la endolevanasa, por lo que se pudo cuantificar la concentración de FOS a lo largo de la reacción.

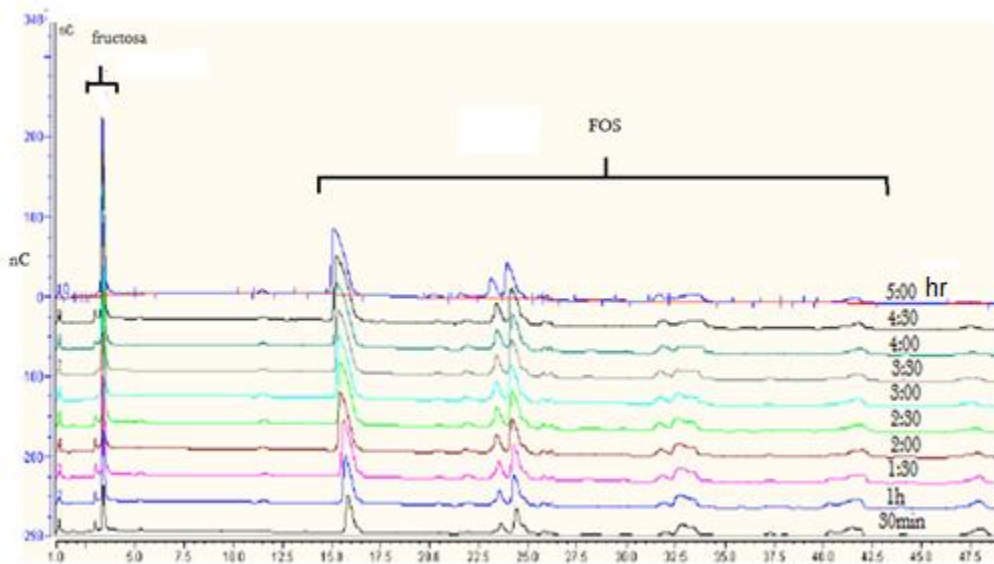


Figura 33. Evolución de los productos de reacción obtenidos a lo largo del tiempo cuando una solución conteniendo 50 g/L de levana de SacB es sometida a la hidrólisis, empleando la enzima LevBI a razón de 1 U/mL. Los productos se analizaron mediante HPAEC-PAD

En el cromatograma de la figura 33 se observa que después de 120 min prácticamente la concentración de FOS se vuelve constante, lo que coincide con los resultados que se presentan en la figuras 34 en las que se detalla la evolución de los productos de la reacción tanto a 50 con a 100 g/L de levana. Como es lógico imaginar, la reacción con 100g/L evoluciona mas lentamente, pero en ambos casos la reacción parece detenerse después de unos 150 min con un rendimiento de FOS del 95%

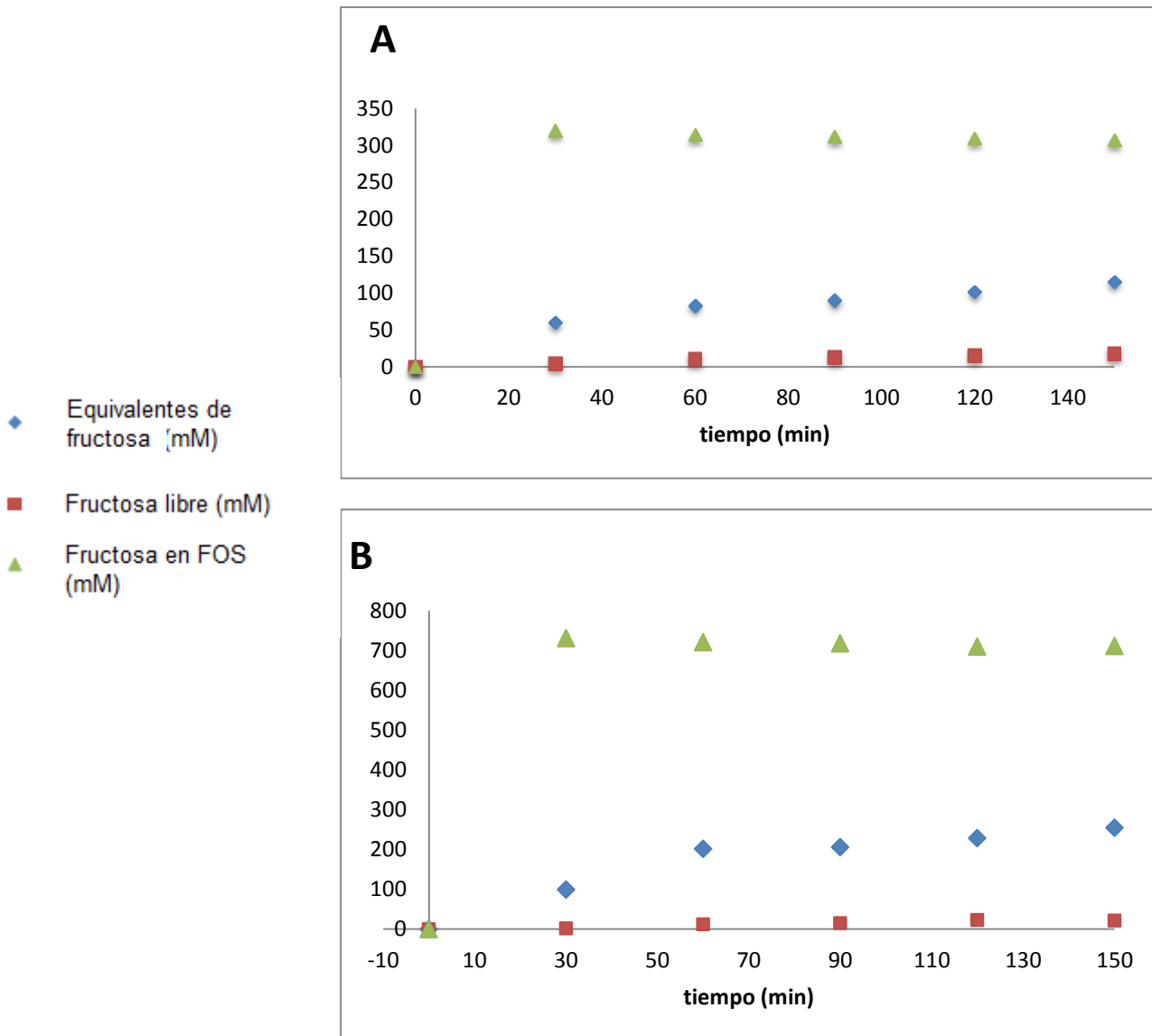


Figura 34. Cinética de producción e FOS a 50 (A) y 100 g/L (B) obtenidos de la hidrólisis de la levana de SacB, empleando la enzima LevBl.

En efecto, en la figura 34, se puede observar que la producción de fructosa tanto en la hidrólisis con 5 % como con 10% de levana es mínima dando lugar a productos de reacción con un porcentaje de FOS de no menos del 90%.

Otra diferencia derivada del comportamiento cinético ya descrito se refiere a la velocidad de producción de fructosa, siendo más alta a mayor concentración de sustrato. Sin embargo, como se señaló, en el sistema endolevanasa/levana, no se alcanza la saturación dado el alto



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

peso molecular de la levana. Como se observa en la figura 35 la velocidad de producción de fructosa es 1.5 veces mayor a una concentración de sustrato de 100 que de 50 g/L. A pesar de esta diferencia, la proporción final de FOS dentro de los productos en ambos casos es de alrededor del 95%.

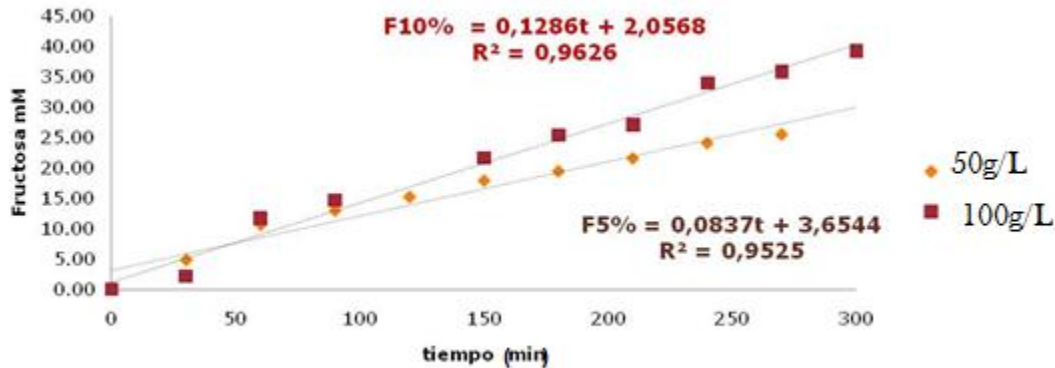


Figura 35. Comparación de la velocidad de producción de fructosa en las cinéticas de producción de FOS a 50 y 100g/L durante la hidrólisis de la levana de SacB, empleando la enzima LevBl.

Se llevó a cabo otro estudio aumentando la temperatura a 45°C empleando una concentración de 100 g/L de levana, con el fin de aprovechar un posible efecto de estabilización de la enzima por la presencia la levana, que permitiera trabajar a una mayor velocidad de producción de FOS.

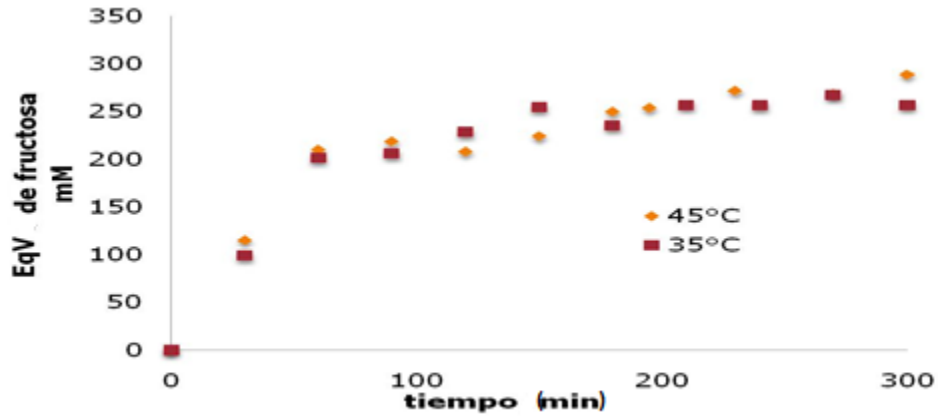


Figura 36. Evolución de la reacción en términos de los equivalentes fructosa en reacciones llevadas a cabo a 35 y 45° C empleando una concentración de 100 g/L de la levadura producida por SacB.

En la figura 36 se puede constatar que no se observó diferencia alguna en la velocidad de liberación de poder reductor y de liberación de fructosa (figura 37) en la evolución de la reacción llevada a cabo a 45 y 35°C. Esto probablemente se deba a que a una alta concentración de sustrato y/o de productos protejan a la enzima de una desnaturalización causada por el aumento en la temperatura, manteniendo el mismo comportamiento cinético que a 35°C.

Como era de esperarse al tener el mismo comportamiento en la producción de reductores y de fructosa, se obtuvieron los mismos rendimientos en FOS a 45 y 35°C, con un porcentaje del 95% de FOS y 5% de fructosa libre a los 150min de reacción.

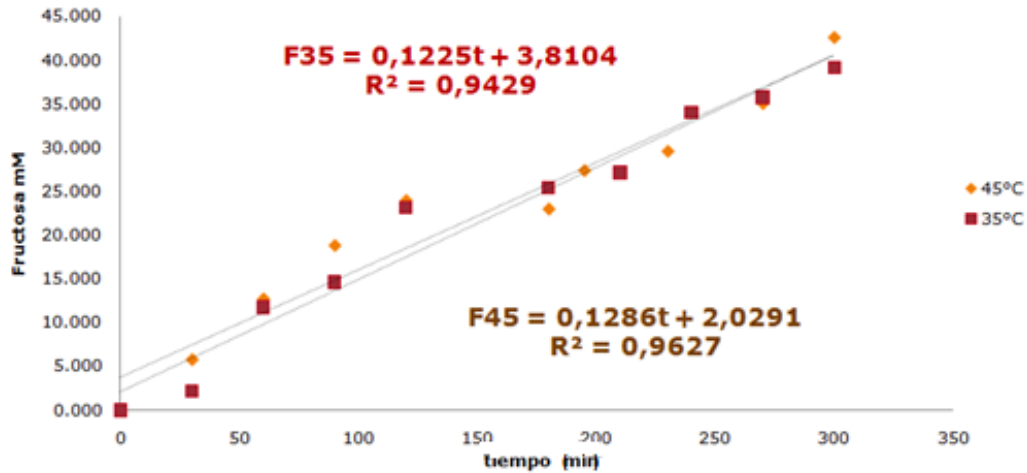


Figura 37. Evolución de la reacción en términos de liberación de fructosa en reacciones llevadas a cabo a 35 y 45° C empleando una concentración de 100 g/L de levana de SacB.

En conclusión, es posible emplear toda una gama de levanas como sustrato para la producción de FOS utilizando la endolevanasa, en particular LevB1, clonada en *E. coli*. Si bien se analizaron diversos factores que afectan la síntesis de levana de SacB llegando a resultar interesantes y atractivos en términos de eficiencia y especificidad, en realidad el proceso funciona adecuadamente con levanas de LevC y LevS, ambas de *L. mesenteroides*. Se seleccionó a la enzima LevB1 por su alta eficiencia y baja producción de fructosa (actividad exo). Se definieron las condiciones de pH (6.0) y de T (35-45°C) dentro de las cuales la enzima funciona adecuadamente. Finalmente se logró obtener un proceso adecuado y eficiente para la producción de FOS con un rendimiento del 95%.

8.5.6 Caracterización estructural de los productos obtenidos.

A partir de un hidrolizado de levana de SacB, empleando 1 U/mL de enzima de LevB1, a pH 6.0 y 35°C en un volumen de reacción de 40 mL se preparó una solución de 300 g/L de FOS. La solución se hizo pasar por un sistema de cromatografía preparativa empleando una columna amino con un flujo de 5 mL/min utilizando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo/agua 75:25. En la figura 38 se muestra un cromatograma en el que se pueden observar los picos que se lograron separar.

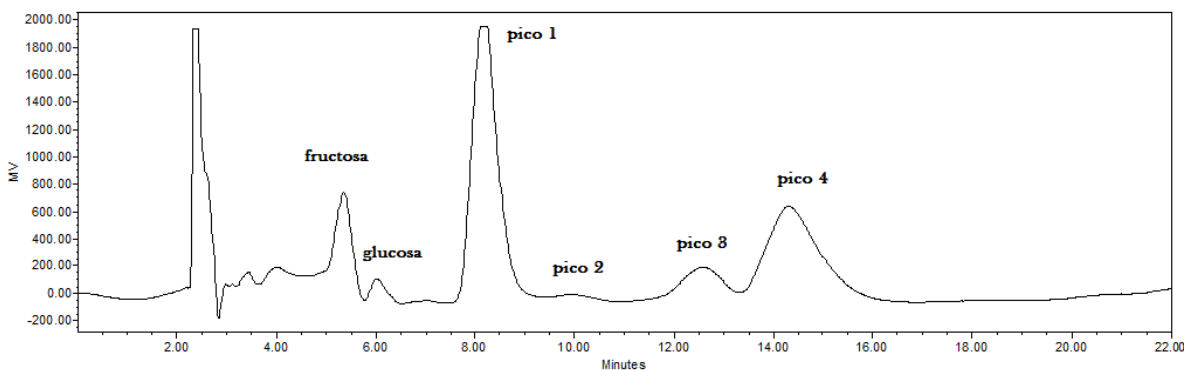


Figura 38. Cromatograma obtenido por HPLC con detector de IR utilizando una columna preparativa para purificar los FOS producidos.

Se recolectaron las fracciones correspondientes a los 4 picos mostrados en la figura anterior y se analizaron nuevamente mediante TLC para confirmar la separación de los FOS correspondientes. Los productos de cada fracción se muestran en la figura 39.

Como se puede observar en la cromatografía en capa fina, la fracción que contiene el pico 1 resulto ser el que contiene al compuesto con mayor pureza, por lo que se decidió analizarlo mediante HPAEC-PAD. Este resultado se muestra en la figura 40.

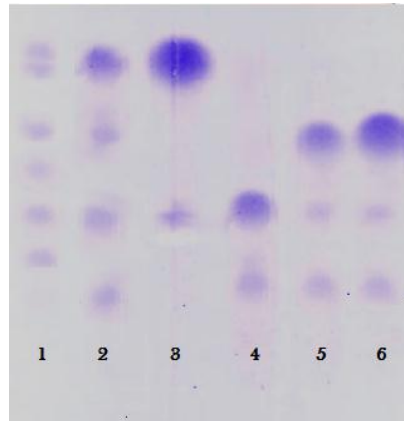


Figura 39. TLC de las fracciones obtenidas mediante HPLC preparativa, carril 1) Estándar de raftilosa con un DP 1-8, carril 2)-Hidrolizado de levana con LevBl, carril 3)-pico 1 purificado ,carril 4) pico 2 purificado, carril 5) – pico 3 purificado, carril 6) pico 4 purificado.

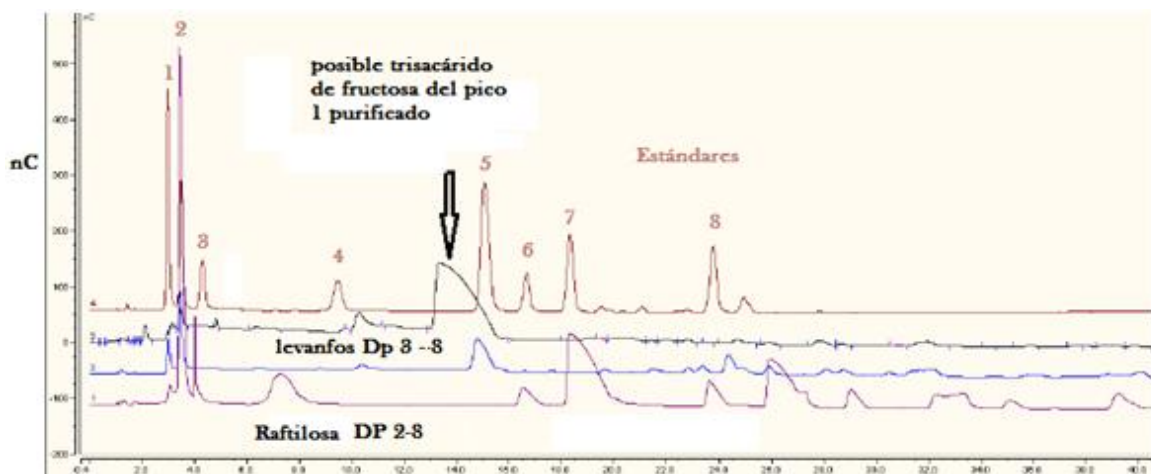


Figura 40. Cromatograma obtenido por HPAEC-PAD de los productos de hidrólisis de levana. En color café se muestran los estándares de 1. Glucosa, 2.fructosa, 3.sacarosa, 4. 1-kestosa, 5.6-kestosa, 6-neokestosa, 7 nistosa, 8.f-nistosa. En negro el pico 1 purificado. En azul el hidrolizado de levana . En morado un hidrolizado comercial de inulina conocido raftilosa.

La fracción que contiene al pico 1 parcialmente purificado mediante cromatografía preparativa, muestra dos señales en el cromatograma por HPAEC-PAD, la de menor intensidad corresponde probablemente a la 1-kestosa según los estándares disponibles, y la de mayor intensidad corresponde posiblemente a un trisacárido de fructosa (levanotriosa) ya que se encuentra localizado entre la 1-kestosa y 6-kestosa. Por un lado Pereira *et al* reportaron que para el caso de la endoelvanasa de *B. subtilis* el producto mayoritario

posiblemente se trate de levanobiosa (disacárido de fructosa con enlaces tipo levana) en resultados basados en una cromatografía en capa fina, mientras que Miasnikov *et al.*, reportaron para su endolevanasa aislada de una bacteria de género *Bacillus sp.*, que el producto mayoritario pueda tratarse de la levanotriosa resultados basados únicamente en el orden de elución de los productos en HPAEC-PAD sin poder comparar con un estándar, misma situación que se presentó en esta investigación.

Por otro lado el producto comercial de raftilosa reporta un contenido de oligofructosa con un DP de 2-8 y que los productos del hidrolizado de levana se encuentran dentro de los mismo tiempos de elución que los del producto comercial, se concluye que el hidrolizado de FOS obtenido por la hidrólisis parcial de la levana de bajo peso molecular empleando la endolevanasa LevBI contiene FOS con un DP que va de 3-8.

### 8.5.7 Capacidad prebiótica de los FOS obtenidos.

Para evaluar la capacidad prebiótica de los FOS obtenidos se llevó a cabo un estudio, en colaboración con la UAM-Xochimilco por la Dra. Rina María González Cervantes, empleando diferentes cepas de bacterias conocidas como prebióticos. Se usaron 3 cepas, 2 de *Bifidobacterium* y una de *Lactobacillus*: *B. bifidum*, *B. longum*, y *L. casei* inducidas primeramente en medio TPY con fructosa al 5% y posteriormente inoculadas en medio KABEL adicionado con las muestras a analizar FOS a una concentración del 0.5%. Los microorganismos fueron crecidos en condiciones de microanaerobiosis monitoreando la densidad óptica y el pH del medio de cultivo.

Con este estudio se observó que todas las bacterias antes mencionadas son capaces de utilizar como fuente de carbono a los FOS producidos enzimáticamente, además de observar un descenso en el pH como se observa en la figura 41. Cabe mencionar que el comportamiento con las 3 cepas en cuanto a disminución de pH y crecimiento microbiano, medido por densidad óptica, es muy similar, con la diferencia de que las bacterias del

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

género *Bifidobacterium* presentan un crecimiento más rápido que las del género *Lactobacillus* evaluado.

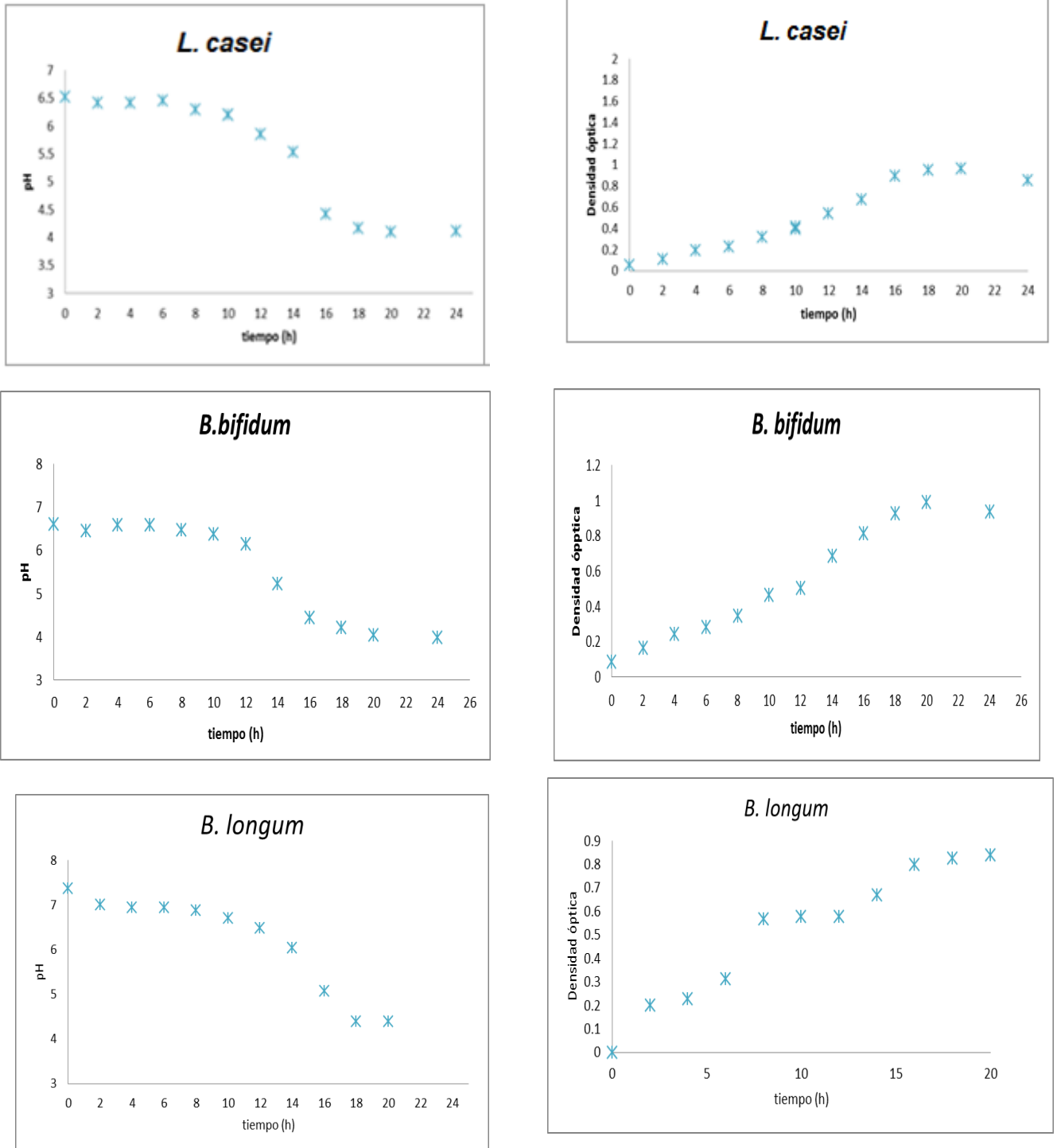


Figura 41. Cinéticas de crecimiento y pH de diferentes bacterias probiótica empleando como única fuente los FOS producidos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Lo único que podemos concluir de este ensayo es que estas cepas son capaces de usar los FOS de levana como fuente de carbohidratos, estudio que concuerda ya reportado.<sup>4</sup> Esto es sólo una prueba inicial para demostrar la capacidad prebiótica de los FOS obtenidos en este proyecto, ya que es importante realizar más pruebas como la variedad y cantidad de ácidos orgánicos producidos por cada una de las cepas durante el crecimiento de estas, así como también hacer estudios con controles negativos utilizando bacterias consideradas no probióticas empleando estos FOS como fuentes de carbono.



## 8.6 Producción FOS sistema combinado SacB y LevBI.

Dado que el proceso diseñado hasta ahora implica la síntesis de levana, su recuperación (eliminación de glucosa) y posterior hidrólisis con LevBI, como una alternativa para hacer más eficiente al proceso de obtención de FOS se pensó en utilizar un sistema combinado empleando simultáneamente a la enzima SacB y a LevBI, de tal manera que se pudiera controlar con mayor precisión el tamaño de los productos al evitar el crecimiento de las cadenas de levana. Con este fin y dado que no existía un antecedente para definir condiciones específicas para el ensayo, se realizaron experimentos empleando por un lado una concentración inicial de sacarosa de 400 g/L una concentración de SacB de 5 U/mL, a pH 6.0 y a una temperatura de 35°C durante 72 h. Por otro lado para la segunda reacción se ensayaron concentraciones de la enzima LevBI de 0.05, 0.1, 0.5 y 1.0 U/mL, agregadas desde un principio a la reacción, con la hipótesis de que a mayor actividad LevBI menor tiempo habría para la síntesis de levana y posiblemente menor peso molecular de los productos. Los resultados se presentan en la figura 42.

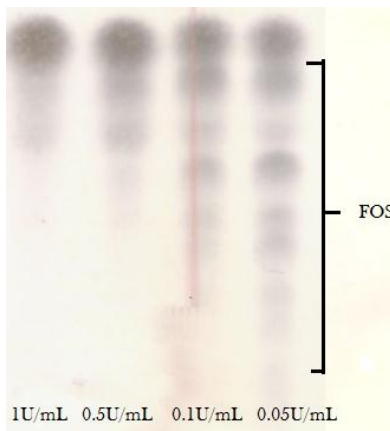


Figura 42. Cromatografía en capa fina de los productos de reacción, en las que se empleó simultáneamente SacB (5 U/mL) y diferentes concentraciones de LevBI: 1.0, 0.5, 0.1 y 0.05 U/mL a una concentración de 400 g/L de sacarosa y después de 72 h de reacción.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como puede constatarse en la figura, se observó la presencia de FOS en los 4 experimentos, sin que en una de las reacciones se observara síntesis de levana, hecho que se confirmó por medio de un análisis por GPC.

Para comprobar que efectivamente no se alcanza a sintetizar levana a lo largo de la reacción se llevó a cabo un estudio cinético empleando concentraciones de enzima de 1 U/mL tanto de fructosiltransferasa como de endolevanasa, a una concentración de 200 g/L (584 mM) de sacarosa.

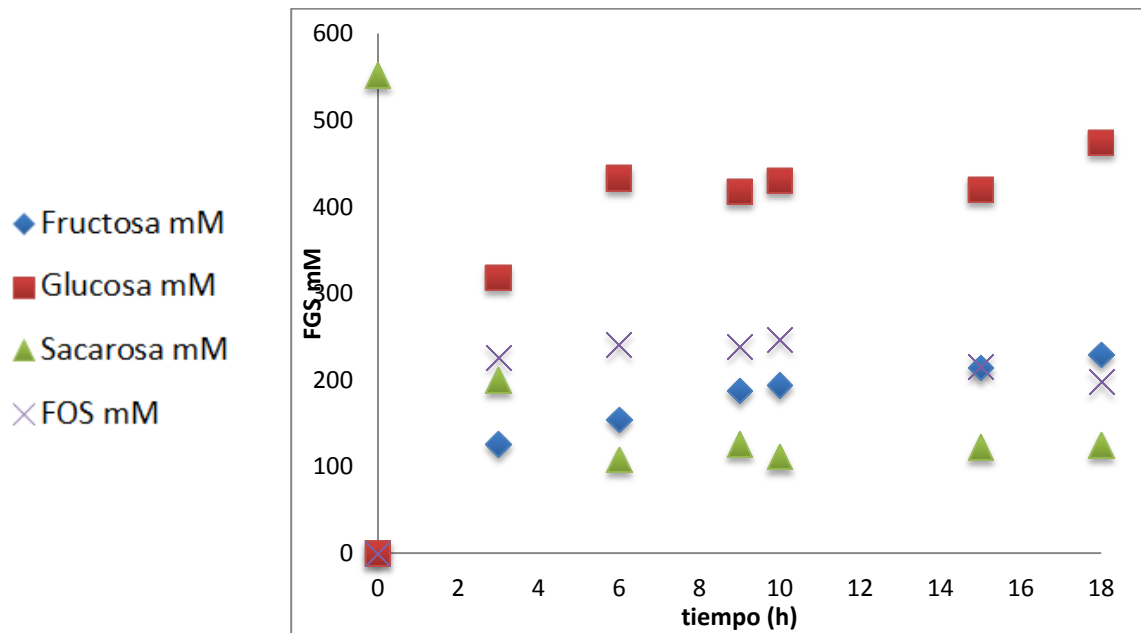


Figura 43. Evolución de la producción de fructo-oligosacáridos empleado el sistema simultáneo Fructosiltransferasa/endolevanasa, a razón de 1 U/mL de cada enzima a 35°C y pH 6.0.

En los resultados que se presentan en la figura 43, se puede observar la reacción llega a su tiempo final prácticamente a las 6 horas de reacción, tiempo al que se observa que ya no hay cambios en las concentraciones de fructosa, glucosa y sacarosa. En el análisis por cromatografía en capa fina se observa (figura 44), que no hay acumulación de levana a lo largo de la reacción, probablemente debido a una alta afinidad de la endolevanasa por los productos de síntesis bajo peso molecular de SacB, que en cuanto son sintetizados, son hidrolizados por LevBI, evitándose así su acumulación en el medio de reacción. Otro punto

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

importante a destacar en este estudio es que el perfil de FOS se mantiene constante a partir de las 6 horas y que la relación hidrólisis/transferencia 40/60 de SacB no se ve afectada por la presencia de la endolevanasa, puesto que el rendimiento de la reacción fue de 45 % de FOS.

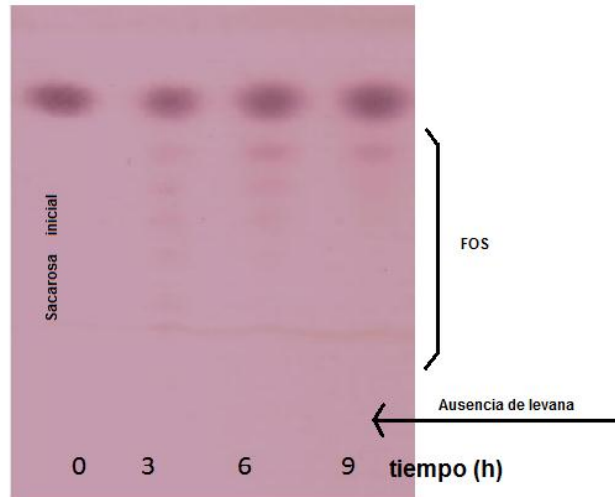


Figura 44. Cromatografía en capa fina los productos obtenidos a lo largo del tiempo durante la reacción de producción de fructo-oligosacáridos empleado el sistema simultáneo Fructosiltransferasa/endolevanasa a razón 1/1 U/mL.

Al comparar ambos sistemas calculando el rendimiento a partir de la sacarosa inicial, el sistema de síntesis e hidrólisis por etapas, bajo las mejores condiciones tanto de síntesis como de hidrólisis, es del 68%, mientras que empleando el sistema simultáneo en las condiciones analizadas en este experimento el rendimiento es de 45%. Con sus respectivas ventajas y desventajas como la de tener glucosa libre en el medio este sistema aún puede ser optimizado explorando aún más las condiciones de reacción.

## 9. Conclusiones

Se logró aislar y clonar dos genes que codifican para enzimas con actividad de endolevanasas: el gen que codifica para la endolevanasa de *B. subtilis* cepa 168, que ya había sido reportado anteriormente, y el gen de la endolevanasa de *B. licheniformis* que sólo había sido considerado como el gen de una enzima hipotética. Se lograron expresar satisfactoriamente ambas enzimas en un sistema heterólogo. La endolevanasa de *B. licheniformis* (LevBI) fue seleccionada por su mejor relación entre su actividad *endo* (productora de FOS) y su actividad *exo* (productora de fructosa). Una vez establecidas las condiciones óptimas de pH y temperatura para la actividad de la endolevanasa LevBI, se logró establecer las condiciones más adecuadas para la producción de FOS a partir de levanas obtenidas de diversas fuentes bacterianas, demostrándose que cualquiera de ellas funciona adecuadamente para el proceso, dando lugar a rendimientos del orden de 95% de FOS. Se exploró para este fin el efecto de la concentración de levana y de enzima y su impacto en la productividad.

En este mismo contexto, se estudió la síntesis del polímero producido por la levansacarasa de SacB, encontrándose una relación directa entre la concentración de enzima y la distribución de peso molecular de la levana producida por esta enzima.

Finalmente se obtuvo el perfil cromatográfico de los FOS que resultan del proceso enzimático, identificando la probable estructura de alguno de ellos y, en colaboración con la UAM-Xochimilco, se evaluó su funcionamiento como fuente de carbono para el crecimiento de bacterias de la microbiota intestinal, demostrando que los FOS obtenidos en este proceso enzimático podrían ser considerados como prebióticos.

## 10. Perspectivas

- Estudiar más a fondo el mecanismo de síntesis de polímero de SacB, para comprender el efecto de la concentración de enzima sobre el perfil de productos, así como las diferencias estructurales entre otras levansacarosas que pudieran dar origen a este mecanismo.
- Analizar la viabilidad de un sistema simultáneo de síntesis/hidrólisis de levana (SacB/LevB1) desde la perspectiva del rendimiento, la productividad y el perfil de productos.
- Analizar la perspectiva anterior considerando la posibilidad de un sistema simultáneo basado en enzimas solubles, biocatalizadores, e incluso el diseño de una proteína quimérica capaz de sintetizar e hidrolizar levana.
- Extrapolar este mismo estudio a un sistema Inulosacarasa/Endoinulinasa para la producción de FOS  $\beta(2-1)$ .
- Encontrar un sistema de purificación para los FOS para poder analizar con mayor detalle el perfil de productos obtenidos para así poder determinar su estructura.
- Continuar con una evaluación más a fondo sobre la capacidad prebiótica de estos FOS, con ensayos en donde se incluya la evaluación con bacterias patógenas, combinaciones entre patógenas y probióticas tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*.

## 11. Bibliografía

- 1.-Gibson R., Probert M., Rastall R. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17, 259–275 (2004).
- 2.-Kolida S., Gibson R. Prebiotic Capacity of Inulin-Type Fructans. *American Society for Nutrition Journal of Nutrition*. 137, 2503-2506 (2007).
- 3.-Jang K., Kang S., Cho H., Kim Y., Lee Y., Hong H., Seong K., Kim,-S.H., Choue R. Prebiotic Properties of Levan in Rats. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13, 348-353 (2003).
- 4.-Marx S., Winkler S., Hartmeier W. Metabolization of  $\beta$ -(2,6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 182, 163-169 (2000).
- 5.- Zhenmig C., She C. Inulinase-expressing microorganism and applications of inulinases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82, 211-220 (2000).
- 6.- Morales S., Rodríguez M., Segovia L., López-Munguía A., Olvera C. Identification and functional characterization of *levS*, a gene encoding for a levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Gene*, 376, 59-67 (2006).
- 7.-Ortiz-Soto M., Rivera M., Rudiño-Piñero E., Olvera C., López-Munguía,A. Selected Mutations in *Bacillus subtilis* Levansucrase. Semiconserved Regions Affecting Its Biochemical Properties. *Protein Engineering Design and Selection* In Press (2008).
- 8.-Olvera C., Centeno S., López-Munguía A. Structural and functional features of fructansucrases present in *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*. 92, 11-20 (2007).
- 9.- Ritsema T., Smeekens S. Fructans: beneficial for plants and humans. *Current opinion in Plant Biology*, 6, 223-230 (2003).
- 10.-Tanaka T., Oi S., Yamamoto T. The Molecular Structure of Low and High Molecular Weight Levans Synthesized by Levansucrase. *Journal of Biochemistry*, 87, 297-303 (1980).

- 11.-Dawes E., Ribbons D. Sucrose Utilization by *Zymomonas mobilis*: Formation of a Levan. *Biochemical Journal*, 98, 804-812 (1966).
- 12.- Hendry J. Evolutionary origins and natural functions of fructans – a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytologist*, 123, 3-14 (1993).
- 13.- Vijn, I., Smeekens, S. Fructan: More than a reserve carbohydrate?, *Plant Physiology*, 120, 351-359 (1999).
- 14.- Hendry G. The origin, distribution and evolutionary significance of fructans, *Science and Technology of Fructans*. CRC Press, 119-139 (1993).
- 15.- López M., Mancilla-Margalli N., Mendoza G. Molecular Structures of Fructans from *Agave tequilana* Weber var. Azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 7835-7840 (2003).
- 16.- Cedeño M. Tequila Production. *Critical Reviews in Biotechnology*. 15 1-11 (1995).
- 17.-Arrizon J., Morelb S., Gschaedlera A., Pierre M. Comparison of the water-soluble carbohydrate composition and fructan structures of *Agave tequilana* plants of different ages. *Food Chemistry*, 122, 123-130 (2010).
- 18.- Gomez E., Gibson R., Klinder A., Costabile A. In vitro evaluation of the fermentation properties and potential prebiotic activity of Agave fructans. *Journal of Applied Microbiology*, 6, 2114-2121 (2010).
- 19.-Velazquez V., Baizabalv V., Bravo-Patiño A., Cajero M., Chávez M., Valdez J. Microbial fructosyltransferases and the role of fructans. *Journal of Applied Microbiology*, 6, 1763-1768 (2009).
- 20.-Roberfroid M., Slavin J. Nondigestible oligosaccharides. *Critical reviews in food science and nutrition*, 40, 461-480 (2000).
- 21.-Elżbieta B., Bielecka M. Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 170-175 (2004).
- 22.-Franck PA. Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, 87, 621-628 (2002).
- 23.- Muñoz I., Rodríguez M., López-Munguía A. Kinetic behaviour and specificity of  $\beta$ -fructosidases in the hydrolysis of plant and microbial fructanas. *Process Biochemistry* 891-898 (2009).

- 24.-Saito K., Kondo K., Kojima I. Purification and Characterization of 2,6- $\beta$ -D-fructan 6-levanbiohydrolase from *Streptomyces exfoliatus* F3-2. Applied and Environmental Microbiology, 252-256 (2000).
- 25.- Saito K, Oda Y, Tomita F, Yokota A. Molecular cloning of the gene for 2,6-beta-D-fructan 6-levanbiohydrolase from *Streptomyces exfoliatus* F3-2. FEMS Microbiology Letters, 28 265-270 (2003).
- 26.- Song E, Hyunjin K, Sung H, Jaeho Cha. Cloning and characterization of a levansucrase from *Microbacterium laevaniformans* ATCC 15953. Gene 291, 45-55 (2002).
- 27.-Miasnikov N. Characterization of a novel endo-levanase and its gene from *Bacillus* sp. L7. FEMS Microbiology Letters, 23-28 (1997).
- 28.- Pereira Y., Petit M., Chambert R. yveB, Encoding endolevanase LevB, is part of the sacB-yveB-yveA levansucrase tricistronic operon in *Bacillus subtilis*. Microbiology, 3413-3419 (2001).
- 29.-Liu C., Lu J., Lu L., Liu Y., Wang F., Xiao M. Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis*. Bioresource Technology, 114, 5528-5533 (2003).
- 30.- Gail L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry 426-428 (1959).
- 31.-Michael W., Preethi R. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. Genome Biology, 5, (2004).
- 32.-Kulminskaya A. Biochemical characterization of *Aspergillus awamori* exoinulinase: substrate binding characteristics and regioselectivity of hydrolysis. Biochimica et Biophysica Acta, 22- 29 (2003).
- 33.-Basso A., Spizzo P. Endo- and Exo-Inulinases: Enzyme-Substrate Interaction and Rational Immobilization. Biotechnol. Prog., 26, (2010).
- 34.- Tanaka T. Synthesis of Levan by Levansucrase. Journal of Biochemistry, 85, 287-293 (1979).
- 35.- Chambert R. Levansucrase of *Bacillus subtilis* : Kinetic and Thermodynamic Aspects of Transfructosylation Processes. Euro Journal of Biochemistry 62, 55-64 (1976).



- 36- Shih I., Yun-ti Y. Selective Production and Characterization of Levan by *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi. *J. Agric. Food Chemistry*, 53, 8211-8215 (2005).
- 37.- Ahmed F., A. Fattah., Doaa A., Mona A. Production of Levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and Enzymic Synthesis of Levan and Fructo-Oligosaccharides. *Current microbiology* 51, 402-407 (2005).
- 38.- Euzenat O., Guibert A., Combes D. Production of Fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. *Process Biochemistry*, 32,237-243 (1997).
- 39.- Goldman D., Lavid N., Schwartz A., Shoham G. Two active forms of *Zymomonas mobilis* levansucrase. *The journal of biological chemistry*, 283,32209-32217 (2008).
- 40.- Meng G., K Fütterer. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nature structural biology*. 10, 935-941 (2003).