



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Producción de fructooligosacáridos a partir de sacarosa mediante procesos
enzimáticos novedosos.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

I.A. Luz Cristina Vallejo García

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Agustín López-Munguía Canales
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Marcela Ayala Aceves
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)
Dr. José Adelfo Escalante Lozada
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos. Febrero, 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

El proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante la beca No. 384366, por el apoyo económico otorgado por la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) a través del proyecto DGAPA/PAPIIT/UNAM IT200316 y el PEI No. 230205.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. ANTECEDENTES	4
2.1. FRUCTANAS.....	4
2.1.1. <i>Las Levanas</i>	5
2.1.2. <i>Las Inulinas</i>	5
2.1.3. <i>Fructanas mezcladas</i>	6
2.2. PROPIEDADES PREBIÓTICAS DE LA INULINA Y LOS FOS.....	6
2.3. APLICACIONES TECNOLÓGICAS DE LA INULINA Y LOS FOS.....	9
2.4. SÍNTESIS DE LAS FRUCTANAS	11
2.4.1. <i>Fructosiltransferasas de plantas</i>	11
2.4.2. <i>Fructosiltransferasas de bacterias y hongos</i>	12
2.4.3. <i>Las Inulinasas</i>	12
2.4.4. <i>Producción de inulina y FOS en la industria</i>	13
2.5. LA INULOSACARASA (ISLA) DE <i>LEUCONOSTOC CITREUM</i>	14
2.6. LA ENDOINULINASA NOVOZYM 960©	18
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. HIPÓTESIS.....	20
5. OBJETIVOS.....	20
5.1. GENERAL	20
5.2. PARTICULARES	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1. CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA.....	21
6.1.1. <i>Determinación de actividad enzimática global</i>	21
6.5.1. <i>Determinación de las tasas de hidrólisis y transferencia de las enzimas</i>	22
6.2. CÉLULAS DE <i>LEUCONOSTOC CITREUM</i>	23
6.2.1. <i>Producción de las células</i>	23
6.2.2. <i>Pruebas de estabilidad en almacenamiento</i>	24

6.2.3. Producción polímero.....	25
6.2.4. Pruebas de estabilidad operacional.....	25
6.3. PROPIEDADES CINÉTICAS DE NOVOZYM 960.....	26
6.3.1. Efecto de la temperatura sobre Novozym 960	26
6.4. PRODUCCIÓN DE FOS	26
6.6. ANÁLISIS DE PRODUCTOS DE REACCIÓN	26
6.6.1. Cromatografía en capa fina (TLC).....	27
6.6.2. Cuantificación de sacarosa, fructosa y glucosa	27
6.6.3. Cromatografía de permeación en gel (GPC).....	28
6.6.4. Cromatografía de intercambio iónico (HPAEC-PAD).....	29
6.7. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	29
6.7.1. Zimogramas.....	29
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
7.1. PRODUCCIÓN DE LAS CÉLULAS DE <i>L. CITREUM</i> CW28	31
7.2. CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO DE LAS CÉLULAS DE <i>L. CITREUM</i>	33
7.3. REVISIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA PRODUCCIÓN DE INULINA A PARTIR DE SACAROSA CON LA ENZIMA ASOCIADA.....	36
7.3.4. Efecto de la caída de pH durante la reacción de síntesis de inulina.	41
7.3.5. Condiciones para producción de inulina.	44
7.3.6. Estabilidad de la enzima en el proceso de producción de inulina.....	45
7.4. ACTIVIDAD DE NOVOZYM 960© SOBRE INULINA DE <i>L. CITREUM</i>	47
7.4.1. Estabilidad de la actividad enzimática de Novozym 960©.....	47
7.4.2. Capacidad hidrolítica de Novozym 960© sobre la inulina bacteriana.....	47
7.4.3. Constantes cinéticas de Novozym sobre inulina bacteriana.....	50
7.4.4. Efecto de la temperatura sobre la actividad de Novozym en inulina bacteriana.....	52
7.4.5. Productos de la reacción de hidrólisis.....	52
7.4.6. Actividad de Novozym 960 sobre sacarosa.....	54
7.5. REACCIONES BI-ENZIMÁTICAS: ISLA Y NOVOZYM 960.	58
8. CONCLUSIONES	63
9. PERSPECTIVAS	64
10. BIBLIOGRAFÍA.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de las fructanas: a) Inulina, b) Neo-inulina, c) Levana, d) Agavinas (Ritsema y Smeekens, 2003).	4
Figura 2. Vía metabólica de las inulinas como prebióticos. La Inulina, los Oligosacáridos y los FOS (inulinas) son ingeridos y pasan por el estómago e intestino delgado sin ser modificados. Al llegar al intestino grueso primero se utilizan los compuestos pequeños (oligosacáridos y FOS) y hacia la parte final la inulina; en las fermentaciones se producen CO ₂ , H ₂ y AGCC y se incrementa la población de bacterias benéficas. (Adaptado de Kelly, 2008).	7
Figura 3. Mecanismo de síntesis de las fructanas mediante fructosiltransferasas. Usando sacarosa como sustrato, las FTFs son capaces de liberar la glucosa y transferir la fructosa a una fructana en crecimiento, a una molécula de agua o a una molécula de otro compuesto.	11
Figura 4. Proceso general para obtener inulina y FOS a partir de raíces de achicoria. Las raíces de achicoria son recolectadas, cortadas y sometidas a un proceso de extracción con agua caliente de modo que se obtiene un jugo. Si el producto final es inulina, el jugo es purificado y secado; si el producto final son FOS u oligosacáridos, es necesaria una hidrólisis antes de la purificación (Franck, 2002).	13
Figura 5. Estructura de los FOS que se producen por hidrólisis de inulina y por síntesis a partir de sacarosa. Del lado izquierdo, con inulina como sustrato y una endoinulinasa, se pueden obtener FOS de tipo GF _n o F _n . Del lado derecho, con sacarosa como sustrato y una FTF se obtienen FOS de tipo GF _n (Singh y col., 2016).	14
Figura 6. Esquema del gen de la inulosacarasa de <i>L. citreum</i> ISIA y sus versiones truncadas (Del Moral, 2008).	17
Figura 7. Perfil de FOS obtenido en cromatógrafo de intercambio iónico de alta eficiencia acoplado a pulsos amperométricos (HPAEC-PAD) que se producen con la versión truncada ISIA4. 1) 1-kestosa, 2) 6-kestosa, 3) neo-kestosa, 4) nistosa y 5) f-nistosa (Peña, 2013).	18
Figura 8. Perfil de FOS de la hidrólisis de Novozym 960 sobre inulina vegetal obtenido mediante HPLC con columna Prevail-Carbohydrate y una fase de acetonitrilo:agua (75:25): F ₂) inulobiosa, G ₇) Sacarosa, F ₃) Inulotriosa, F ₄) inulotetraosa, F ₅) inulopentosa (Mutanda y col., 2008).	19
Figura 9. Una placa TLC con estándares de FOS, sacarosa, fructosa e inulina.	27
Figura 10. Cromatograma de un estándar de una solución de 10 g/L de fructosa, glucosa y sacarosa en la columna Prevail con acetonitrilo:agua (70:30).	28

Figura 11. Cromatograma de permeación en gel (GPC) de un estándar de inulina de <i>L. citreum</i> a 10 g/L con NaNO ₃ 0.1 M.....	28
Figura 12. Cromatograma de intercambio iónico de alta eficiencia acoplado a pulsos amperométricos (HPAEC-PAD) de un estándar de FOS tipo $\beta(2-1)$: una mezcla comercial (Raftilosa P95 de Orafti) de FOS con GP 2 a 7 y estructuras GF _n y F _n	29
Figura 13. Evolución del cultivo de <i>Leuconostoc citreum</i> CW28 en medio Lm a 30°C y 200 rpm. La fase exponencial comienza en la segunda hora de cultivo, y la fase estacionaria empieza después de la quinta hora de cultivo.	31
Figura 14. Evolución del consumo de sustrato y liberación de azúcares durante el cultivo de células de <i>Leuconostoc citreum</i> CW28 en medio Lm a 30°C y 200 rpm. La caída drástica de la concentración de la sacarosa coincide con la etapa exponencial del cultivo, mientras que la aparición de fructosa y glucosa es evidencia de la actividad de la enzima; la disminución de la glucosa se debe a su uso por la bacteria.....	32
Figura 15. Evolución del crecimiento (DO) y de la actividad global (U/mL) durante el crecimiento de <i>Leuconostoc citreum</i> CW28 en medio Lm a 30°C y 200 rpm. La actividad enzimática global que se obtiene está directamente relacionada con la cantidad de células que se producen en el cultivo.	33
Figura 16. Estudio comparativo de estabilidad de la actividad inulosacarasa en células almacenadas de tres distintas formas. Las células congeladas mantuvieron la actividad global durante el experimento, al igual que las liofilizadas que perdieron alrededor del 25% de actividad con la liofilización. Las células refrigeradas fueron perdiendo actividad durante todo el experimento.	34
Figura 17. Cromatograma de permeación en gel (GPC) de la reacción de 1 U/mL y 100 g/L de sacarosa. Cada línea representa la muestra a diferentes horas, la línea superior es un estándar de inulina, de modo que se aprecia que en el resto de las muestras no hay inulina.	36
Figura 18. Fotografías de las vistas al microscopio de las células de <i>L. citreum</i> solubilizadas (a) y tratadas con la tinción de Gram (b) (100X).....	37
Figura 19. Cromatograma de muestras de cultivo durante el crecimiento de <i>L. citreum</i> . En todas las muestras hay inulina.	38
Figura 20. Zimograma de células de <i>L. citreum</i> . 1) células refrigeradas, 2) células congeladas. La ISLA está señalada con la flecha azul.	39
Figura 21. Producción de inulina y comportamiento del pH de la reacción con soluciones amortiguadoras de diferente capacidad. Al incrementar la capacidad de amortiguamiento de la solución de la reacción, el pH se mantiene y la enzima puede producir inulina.	40

Figura 22. Cromatograma de la producción de inulina con 1 U/mL de *IsIA* y 100 g/L de sacarosa en amortiguador de fosfatos 200 mM pH 6.5. Al paso del tiempo de la reacción es posible observar un cambio en la señal de la inulina, que podría corresponder con una disminución en la masa molecular. 41

Figura 23. TLC de la reacción 1U de células, 9 g/L de inulina bacteriana a pH 6.5 y 4.0. Las manchas en la parte inferior demuestran la existencia de polímero. La ausencia de manchas en la parte media y superior de la placa indica que la muestra no contiene productos de hidrólisis de inulina. 42

Figura 24. Perfil cromatográfico (GPC) de la inulina bacteriana en reacción con células de *L. citreum* al inicio y después de 7 horas de incubación. Se observa el cambio en la señal de la inulina, que correspondería a un cambio en su masa molecular. 43

Figura 25. Zimograma cargado de inulina. Carriles 1: marcador de masa molecular. 2 y 5 células sin reacción. 3, 4, 6 y 7 células recuperadas de la reacción de síntesis con pH final 4.0. No hay halos transparentes que indiquen la existencia de una inulinasa. 44

Figura 26. Determinación de la actividad operacional de la enzima *IsIA* asociada a las células de *L. citreum* y producción de inulina en ciclos de síntesis. La actividad reportada es con la que se inicia cada ciclo y la cantidad de inulina reportada es la obtenida al final de cada reacción. 46

Figura 27. Productos obtenidos en reacciones de hidrólisis de inulina de *L. citreum* con diferentes cantidades de Novozym 960©, observados mediante TLC. 48

Figura 28. Zimograma del preparado de Novozym 960©. 1: marcador de masa molecular, 2: Novozym 960© teñido con Blue stain, los carriles del lado derecho (morado) son de Novozym 960© teñidos con reactivo de Schiff. Las bandas transparentes del lado derecho demuestran la actividad inulinasa contenida en la banda correspondiente. 49

Figura 29. Evolución de los productos obtenidos en reacciones con Novozym 960© sobre inulina de *L. citreum* (40 g/L) a través del tiempo, observados mediante TLC. 49

Figura 30 Evolución de los productos obtenidos en reacciones con Novozym 960© sobre inulina de achicoria (HP, 40 g/L) a través del tiempo, observados mediante TLC. 50

Figura 31. Comportamiento cinético de Novozym 960 sobre inulina de *L. citreum* a 30°C. Se utilizó un rango de concentraciones de inulina desde 1 hasta 60 g/L y 25 U/mL de reacción de Novozym 960. 51

Figura 32. Efecto de la temperatura sobre Novozym 960 con inulina bacteriana y de achicoria. Al incrementar la temperatura de la reacción, existe un mayor efecto en la actividad de la enzima sobre la inulina de achicoria que sobre la bacteriana (*L. citreum*). 52

Figura 33. Evolución de la reacción de hidrólisis de la inulina bacteriana con la endoinulinasa Novozym 960, mediante la cuantificación de FOS y la liberación de fructosa. Condiciones de reacción: 50 U/mL con 40 g/L de inulina a 30°C, pH 6.5.....	53
Figura 34. Cromatogramas de HPAEC-PAD que muestran la evolución de los productos de hidrólisis de inulina de <i>L.citreum</i> mediante la endoinulinasa Novozym 960.	54
Figura 35. Cromatogramas de HPAEC-PAD que muestran la evolución de los productos de síntesis a partir de 250 g/L de sacarosa empleando 50U/mL de la endoinulinasa Novozym 960. Además de FOS F_n y GF_n , se identificaron: blastosa (Bl), 6-kestosa (6-k), neo-kestosa(N-k) y bifurcosa (Bf).....	55
Figura 36. Perfil de productos de la reacción de 4h con 50 U/mL de Novozym 960 y 250 g/L de sacarosa a 60 °C.....	56
Figura 37. TLC de los productos obtenidos mediante una reacción de 14 h y 30°C, con sacarosa como sustrato y las bandas preparadas del gel de proteínas presentes en el producto Novozym 960. Las manchas en el carril 5 son FOS sintetizados por una enzima contenida en la banda que contiene la endoinulinasa.	57
Figura 38. Cromatogramas HPAEC-PAD de los productos de reacciones bi-enzimáticas con diferentes concentraciones de Novozym 960 (1, 2, 3, 5, 8 y 10 U/mL) y una concentración de 5 U/mL de IsIA. Las reacciones se llevaron a cabo con 250 g/L de sacarosa durante 4 horas a 30°C.	59
Figura 39. Comparación del perfil de productos obtenidos en la reacción bi-enzimática de IsIA-Novozym 960 (línea verde) y la reacción directa de Novozym 960 sobre sacarosa (línea negra). Los productos (señales) de cada cromatograma se corresponden, de modo que son el mismo producto.	59
Figura 40. Evolución de los productos de la reacción bi-enzimática analizados por TLC. Las condiciones de reacción se señalan dentro de la figura.	60
Figura 41. Evolución de los productos de reacción de Novozym 960 con sacarosa. No hay formación de inulina.....	61
Figura 42. Evolución de la relaciones transferencia/hidrólisis y producción de inulina en la reacción bi-enzimática 5 U/mL de IsIA y 10 U/mL de Novozym con 250 g/L de sacarosa.	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Algunos usos de las inulinas en la industria alimentaria.....	9
Tabla 2. Resultados del estudio de caracterización fisicoquímica y cinética de <i>Is/A</i> y sus versiones truncadas.....	17
Tabla 3. Composición del medio de cultivo Lm.....	23
Tabla 4. Comparación de la actividad enzimática en medio Lm alcanzada en el cultivo de células de <i>L. citreum</i> CW28.....	33
Tabla 5. Condiciones usadas para la producción de inulina con amortiguador de fosfatos 200 mM pH 6.5.....	41
Tabla 6. Condiciones de síntesis de inulina con amortiguador de fosfatos 300 mM, pH 6.5 y enzima de células liofilizadas.....	45

RESUMEN

Los Fructooligosacáridos (FOS) son compuestos de gran interés comercial debido a sus características prebióticas. Se pueden obtener tanto por hidrólisis química como enzimática de la inulina de plantas, así como por síntesis directa a partir de sacarosa por medio de enzimas de tipo fructosiltransferasa fungales o bacterianas. En este trabajo se exploró inicialmente la factibilidad de producir FOS de manera independiente a la disponibilidad de inulina vegetal, mediante una reacción enzimática simultánea de síntesis e hidrólisis. Para este efecto se empleó la Inulosacarasa (IsIA) de *Leuconostoc citreum* CW28, capaz de sintetizar inulina de alto peso molecular (3000 kDa), equivalente a un alto grado de polimerización (18000 unidades aprox.) y la endoinulinasa Novozym 960. Se determinaron las mejores condiciones para producir inulina, que resultaron ser: 5 U/mL de IsIA y 250 g/L de sacarosa como sustrato a 30°C en amortiguador de acetatos 0.3 M pH 6.5, obteniéndose hasta 40 g/L de inulina, es decir, un 16% de rendimiento con respecto a la sacarosa. Aunque las condiciones de operación de la endoinulinasa son relativamente diferentes, se demostró la capacidad de esta enzima para trabajar en las mismas condiciones que la inulosacarasa para llevar a cabo la reacción de forma simultánea. Sorprendentemente, al llevar a cabo ensayos para verificar la actividad de la endoinulinasa sobre sacarosa, se encontró que puede usarla como sustrato para producir FOS de diversos tipos y grados de polimerización. En las reacciones empleando ambas enzimas en forma simultánea, se obtuvo un perfil de productos (FOS) muy similar al producido por Novozym 960 directamente sobre sacarosa, aunque en la reacción bi-enzimática se observa la formación de inulina. **Cuando ambas enzimas trabajan juntas se obtiene un perfil de productos diferente al de las reacciones de síntesis e hidrólisis de inulina individualmente.**

1. INTRODUCCIÓN

Los Fructooligosacáridos (FOS) y la inulina constituyen hoy en día productos indispensables en la industria de los alimentos debido a las características tecnológicas y propiedades prebióticas que poseen. En el 2012 el mercado global de prebióticos era de poco más de un billón de dólares y ha estado en crecimiento, aumentando tasas anuales de 10 a 15%, por lo que se espera que llegue a los 4.5 billones de dólares en el 2018. (TRM, 2013).

La inulina se obtiene directamente a partir de las raíces de achicoria y algunas otras plantas, mientras que los FOS se producen mediante la hidrólisis controlada ya sea química o enzimática de la inulina vegetal (Singh y col., 2016). Por lo tanto, la producción de ambos compuestos está limitada por las necesidades fisiológicas de la planta, su ciclo vegetativo, las condiciones climatológicas y la disponibilidad de suelo agrícola cultivable.

Como consecuencia de lo anterior, se han buscado métodos de alta productividad y factibilidad económica para la obtención de FOS e inulina que resulten además de fácil control. En este sentido, el uso de enzimas para su síntesis directa a partir de sacarosa o hidrólisis de inulina vegetal, ha demostrado ser una manera más efectiva de producirlos. Por esta razón, se han hecho múltiples estudios relacionados con la búsqueda de enzimas estables que tengan un alto rendimiento en la reacción de hidrólisis, encontrando como fuentes potenciales a hongos, levaduras y bacterias (Ganaie y col., 2014; Singh y col., 2016). En los procesos enzimáticos para producir FOS se obtienen productos de bajo grado de polimerización (GP), fracciones de monosacáridos y sustrato residual que generalmente deben ser eliminados mediante un proceso de purificación (Singh y col., 2016).

Entre las enzimas capaces de sintetizar FOS a partir de sacarosa, existen unas pocas que pueden producir inulina. Sin embargo, la hidrólisis de ésta inulina para obtener FOS es un proceso que no se ha explorado todavía, y mucho menos la síntesis e hidrólisis llevadas a cabo de forma simultánea.

En el laboratorio de Tecnología Enzimática del IBt UNAM, desde hace varios años se trabaja en la búsqueda de opciones para producir inulina y FOS enzimáticamente a partir de estrategias tanto de ingeniería de reacción, identificando y caracterizando las mejores condiciones para que la reacción enzimática se lleve a cabo; o bien mediante ingeniería de proteínas, modificando en la enzima los residuos que participan en la polimerización de las fructanas y favorecer así la síntesis de FOS.

En 2002, Olivares-Illana y col. caracterizaron una inulosacarasa (IsIA) proveniente de la bacteria láctica *Leuconostoc citreum* CW28, que es capaz de producir inulina a partir de sacarosa, y en 2004

Ortíz-Soto y col. realizaron experimentos para optimizar la producción del polímero, tomando en cuenta la naturaleza y concentración del catalizador enzimático, la concentración de sustrato y las condiciones de reacción. Paralelamente, se han hecho diversas aportaciones al proceso a través del estudio de la enzima recombinante, que Olivares-Illana y col. (2003) produjeron expresando el gen *IsIA* en *E. coli*. Se caracterizó la enzima recombinante en su forma completa, así como variantes truncadas a las que se eliminó una porción del dominio C terminal, encontrando las condiciones bajo las cuales, las variantes son capaces de producir inulina o FOS (Del Moral, 2008; Peña, 2014). Estos procesos no han podido ser implementados a gran escala, debido a que en todos los casos las enzimas resultantes tienen vidas medias muy cortas (400 min o menos) en condiciones de reacción (35°C) (Olivares-Illana y col., 2003; Del Moral, 2008).

En este contexto, el objetivo de este trabajo consistió en evaluar la factibilidad de la producción de FOS mediante un proceso novedoso: el uso de la *IsIA* asociada a las células de *L. citreum* y una endoinulinasa comercial en un proceso simultáneo con sacarosa como sustrato, analizando el comportamiento de ambas enzimas y el perfil de productos que se obtenga de la reacción simultánea.

Se presentan los resultados relacionados con la producción de *IsIA* mediante cultivos de células de *L. citreum*, la caracterización de la estabilidad de la enzima asociada a las células bajo diferentes condiciones de almacenamiento, así como, la estabilidad de la enzima en operación, es decir, la retención de actividad enzimática en las células después de varios ciclos de producción. Se presenta también la caracterización de la endoinulinasa comercial, incluida la capacidad de hidrólisis de inulina bacteriana bajo diferentes condiciones de reacción y el estudio cinético de la misma. En lo tocante a los FOS obtenidos de esta reacción, se analizan los perfiles de las reacciones bi-enzimáticas simultáneas, **demostrando que ambas enzimas pueden trabajar simultáneamente sobre sacarosa y que el perfil de productos que se obtiene es diferente al obtenido por hidrólisis o síntesis de inulina individualmente.**

2. ANTECEDENTES

2.1. Fructanas

Las fructanas son polímeros u oligómeros de fructosa que forman parte de los carbohidratos de reserva de por lo menos el 15% de las plantas con flores (Ritsema y Smeekens, 2003). Estos compuestos también son producidos por una gama de bacterias que incluyen patógenos de plantas y bacterias de la microbiota oral e intestinal de animales (Vijn y Smeekens, 1999).

Las fructanas se clasifican según el tipo de enlace que une a sus monómeros, como de tipo levana, que contienen mayoritariamente enlaces $\beta(2-6)$, y de tipo inulina con enlaces $\beta(2-1)$ (Olivares-Illana y col., 2002). Algunas fructanas pueden contener un residuo glucosilo inicial (fructanas tipo GF_n) aunque no siempre es el caso, particularmente por la existencia de productos de hidrólisis de polímero (fructanas tipo F_n) (Roberfroid, 2007). Existe un tercer grupo de fructanas que se encuentran principalmente en las plantas de agave y que contienen tanto enlaces $\beta(2-1)$ como $\beta(2-6)$, formando estructuras ramificadas y complejas, así como cadenas a partir del carbono 6 (C_6) de la glucosa (neo-fructanas F_nGF_n) (Ávila, 2009) (Figura 1).

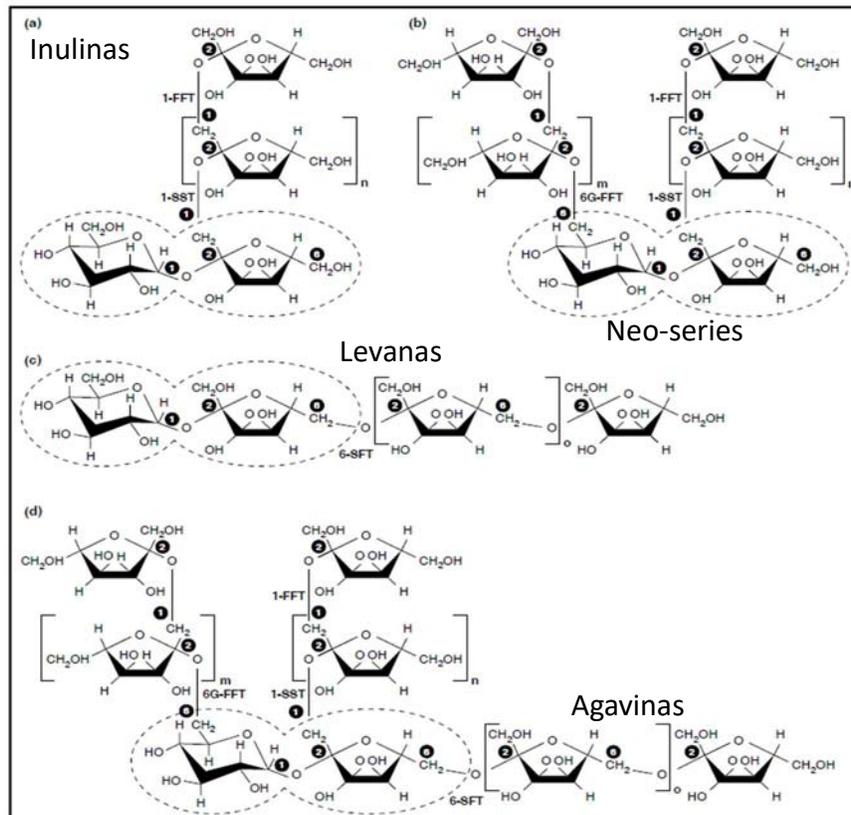


Figura 1. Estructura química de las fructanas: a) Inulina, b) Neo-inulina, c) Levana, d) Agavinas (Ritsema y Smeekens, 2003).

2.1.1. Las Levanas

Las levanas son fructanas con enlaces $\beta(2-6)$ en la cadena principal, que pueden tener ramificaciones en $\beta(2-1)$, dependiendo del origen de la enzima que las sintetice. Son producidas principalmente por microorganismos, entre los que se encuentran *Bacillus subtilis*, *Zymomonas mobilis*, *Aerobacter levanicum*, *Streptococcus salivarius* y algunas cepas de *Lactobacillus*. También son producidas por algunas gramíneas como *Agropyron cristatum*, *Dactylis glomerata* y *Poa secunda*. En los microorganismos, la levana contribuye a la formación de biopelículas y en las plantas funciona como carbohidrato de reserva (Srikanth y col., 2015).

Como polímeros, las levanas son biocompatibles, biodegradables, flexibles y amigables con el ambiente. Han demostrado tener propiedades biomédicas pues pueden servir como antioxidantes, antiinflamatorios y anticancerígenos. Así mismo, pueden ser un componente adecuado en la dieta de pacientes con diabetes. Además, son agentes espesantes y adhesivos naturales por lo que se usan ampliamente en la industria cosmética (Srikanth y col., 2015).

2.1.2. Las Inulinas

Las inulinas son fructanas con enlaces $\beta(2-1)$ en la cadena principal y enlaces tipo $\beta(2-6)$ en ramificaciones. Son producidas principalmente por plantas que las utilizan como carbohidrato de reserva y además contribuyen a la resistencia de las mismas contra bajas temperaturas, sequía y salinidad (Ritsema y Smeekens, 2003). También son producidas por microorganismos, entre los que destacan los géneros *Aspergillus*, *Bacillus* y *Penicillium* (Ganaie y col., 2014).

Las inulinas se han clasificado según el número de monómeros que forman sus cadenas, es decir, su grado de polimerización (GP). Pueden clasificarse como “inulinas nativas” cuando el GP es elevado (más de 60 unidades), “oligosacáridos” (con GP entre 10 y 20 unidades) y “Fructooligosacáridos” (FOS, de 2 a 10 unidades). Las inulinas de plantas contienen generalmente poco más de 200 unidades fructosilo, mientras que las inulinas bacterianas pueden alcanzar más de 20,000 (Ritsema y Smeekens, 2003; Ortíz-Soto y col, 2004).

Las inulinas han sido estudiadas ampliamente, debido a que se ha demostrado que cuando son consumidas en la dieta tienen efectos benéficos en la salud humana a través de su fermentación selectiva en el colon, por lo que están consideradas como prebióticos (Roberfroid, 2007).

2.1.3. Fructanas mezcladas

Las fructanas mezcladas son estructuras complejas formadas por cadenas de fructosilos con enlaces tanto en $\beta(2-1)$ como $\beta(2-6)$ en las ramificaciones y con un GP de 3 a 30 unidades. Los estudios estructurales muestran que en este tipo de fructanas las cadenas de fructosa se pueden desarrollar a partir también del carbono 6 de la glucosa, dando lugar a las denominadas neoserias, es decir, fructanas en las cuales la glucosa se encuentra al interior de la molécula, y no en un extremo terminal, como sucede en la inulina o la levana (Figura 1d). Se encuentran principalmente en las plantas de agave, por lo tanto son conocidas como agavinas. Al igual que la inulina, las agavinas forman parte de los carbohidratos de reserva de los agaves y contribuyen al desarrollo de la planta y a su resistencia en ambientes secos (Ávila, 2009).

Durante mucho tiempo, en México se han utilizado las fructanas del agave como fuente de carbohidratos para la fermentación alcohólica en la producción de bebidas como el tequila y el mezcal. Recientemente han comenzado a utilizarse como materia prima para la producción de jarabes de fructosa, fructanas de alta pureza, inulina y FOS (Ávila, 2009; Praznick y col, 2013).

2.2. Propiedades prebióticas de la inulina y los FOS

Los prebióticos son componentes o ingredientes de los alimentos cuya fermentación selectiva permite cambios específicos, ya sea en la composición o la actividad de la microbiota intestinal, confiriendo beneficios de bienestar y salud al hospedero. Para que un compuesto sea clasificado como prebiótico debe cumplir con ciertas características: 1) no ser hidrolizado o absorbido en la parte superior del sistema digestivo, 2) ser un sustrato selectivo para un limitado grupo de bacterias benéficas que habiten el colon, de manera que estimule su crecimiento o las active metabólicamente, 3) que consecuentemente altere la flora del colon hacia una composición más saludable e 4) inducir efectos sistémicos benéficos para el hospedero (Gibson y col., 2004).

Para determinar si las fructanas tipo inulina tienen un efecto prebiótico y por lo tanto, benéfico en la salud de los seres humanos, se han realizado muchas investigaciones en las últimas cuatro décadas. El enlace de las moléculas de fructosa en éstos compuestos no puede ser hidrolizado por las enzimas del sistema digestivo humano, por lo que pasan a través de la boca, estómago e intestino delgado sin cambios significativos y sin ser metabolizados, hasta que llegan al intestino grueso o colon donde pueden ser fermentados por la microbiota. Éstas evidencias permiten clasificarlos como fibra dietética (Moser y col., 2014). Más allá de esta propiedad, se ha demostrado que la

inulina y los FOS pueden modular la composición de la microbiota del colon, lo que está directamente relacionada con la salud del hospedero. En investigaciones recientes se ha determinado que la microbiota gastrointestinal tiene interacción con el epitelio del intestino grueso, participando activamente en la regulación de varias vías metabólicas, así como respuestas inmuno-inflamatorias conectadas con el sistema digestivo, el hígado, el cerebro y los músculos. También se ha demostrado que el desbalance de microorganismos en el colon (disbiosis) pueden causar enfermedades como el síndrome del colon irritable, obesidad, síndrome metabólico, diabetes tipo 1, alergias, enfermedad Celiaca e incluso algunos tipos de autismo, aunque las relaciones causa-efecto han sido difíciles de establecer. Por ejemplo, en personas enfermas se ha notado un incremento en la proporción de enterobacterias (Moser y col., 2014).

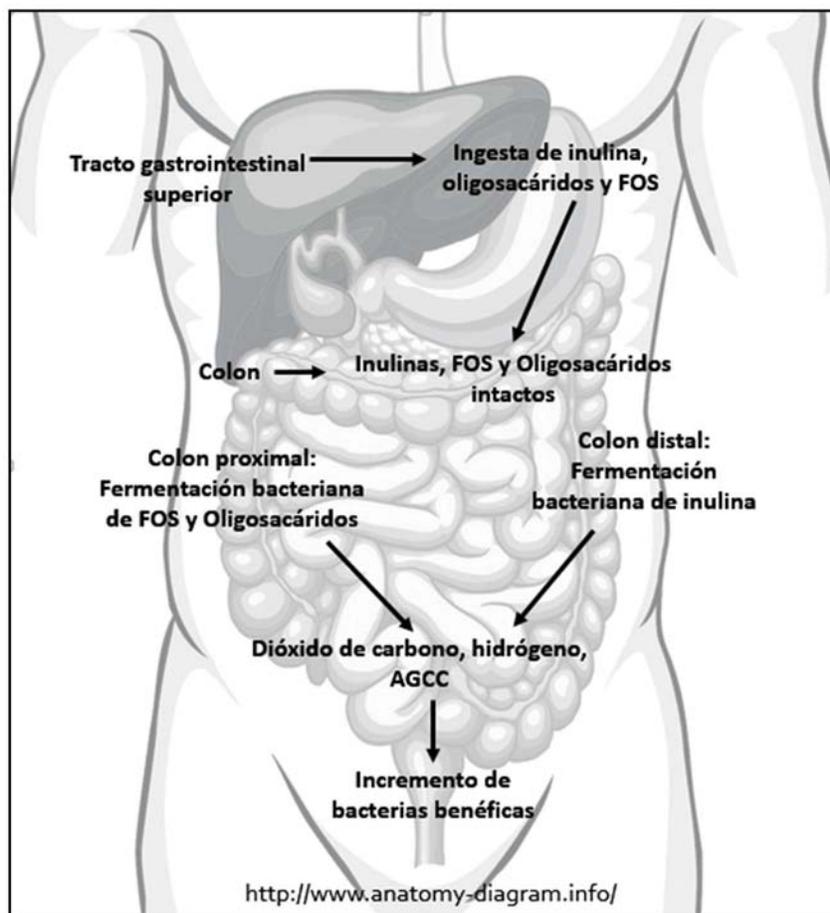


Figura 2. Vía metabólica de las inulinas como prebióticos. La Inulina, los Oligosacáridos y los FOS (inulinas) son ingeridos y pasan por el estómago e intestino delgado sin ser modificados. Al llegar al intestino grueso primero se utilizan los compuestos pequeños (oligosacáridos y FOS) y hacia la parte final la inulina; en las fermentaciones se producen CO, H₂ y AGCC y se incrementa la población de bacterias benéficas. (Adaptado de Kelly, 2008).

Dentro de esta microbiota benéfica, se han identificado grupos de bacterias, como *Bifidobacterium* spp., algunos tipos de *Lactobacillus* y *Faecalibacterium*, que son capaces de fermentar FOS (GP 2 a 7) para obtener energía, con la consecuente producción de ácido láctico y ácidos grasos de cadena corta (AGCC) principalmente propionato, butirato y acetato (Kelly, 2008). Éstos compuestos pueden servir como fuente energética para otros grupos de bacterias y desde luego para el ser humano. Además, los AGCC tienen efecto sistémico en la homeostasis de la glucosa y lípidos, de manera que pueden contribuir a la saciedad, así como al control de la obesidad y la hiperglicemia. Los AGCC junto con el ácido láctico logran que el pH del microambiente del colon disminuya, impidiendo que bacterias patógenas puedan incrementar su población y repercutir en la salud del hospedero. (Moser y col., 2014). En particular, la producción de butirato ha demostrado tener un efecto en la inmunidad del hospedero al fortalecer las defensas de la mucosa intestinal e incrementar las respuestas del organismo ante desafíos de salud (Sangeetha y col., 2005).

En otros estudios se ha demostrado que la ingesta de inulina y FOS (mezclas con GP 2 a 60) , mejora la absorción de minerales como el calcio e incrementa la recepción de vitamina D como consecuencia de la disminución del pH, aumentando la mineralización de los huesos y previniendo enfermedades como la osteoporosis (Roberfroid, 2007).

En el caso de la lucha contra el cáncer, la ingesta de FOS e inulina ha demostrado tener efectos positivos al evitar la aparición de cáncer de colon, cuando estos compuestos pueden ser utilizados para producir AGCC (Barclay, 2010; Sangeetha y col., 2005). En estudios con roedores con dietas altas en éstos compuestos (15% de la dieta basal), se ha observado una disminución en la aparición de tumores mamarios inducidos y en la incidencia de metástasis pulmonar ocasionada por tumores musculares, así como una reducción en el crecimiento de tumores malignos trasplantados (Sangeetha y col., 2005).

En la gran mayoría de los estudios *in vivo* se han utilizado productos comerciales que son mezclas de inulina y FOS tipo inulina con diversos tamaños (GP) y estructura (FOS tipo F_n y GF_n) (Abed y col., 2016; Kolida & Gibson, 2007; Kolida y col., 2002). Por otro lado, los estudios *in vitro* con diferentes cepas de bacterias benéficas del sistema digestivo humano, han demostrado que los FOS con menor GP (principalmente entre 2 y 6) favorecen el crecimiento de las mismas (Shoaib y col., 2016; Guarner, 2007; Sannohe y col., 2007).

2.3. Aplicaciones tecnológicas de la inulina y los FOS

La inulina y los FOS poseen características físico-químicas únicas. Presentan buena solubilidad en agua debido a que los grupos hidroxilo los hacen polares. En el caso de la inulina, ésta es capaz de formar geles a concentraciones de entre 13-15%, de manera que puede ser utilizada como reemplazo de grasas en la preparación de alimentos. Los FOS presentan un poder edulcorante menor comparado con el de la sacarosa (alrededor de 35%) que aumenta conforme decrece la longitud de la cadena que las constituye, pero que presenta cierta sinergia con otros edulcorantes disminuyendo el resabio amargo que producen, además no son cariogénicos (Franck, 2002).

Estas características, junto con la evidencia de que son productos benéficos para la salud humana les ha valido el estatus GRAS (Generalmente Reconocidos como seguros, por sus siglas en inglés) de la Administración de Fármacos y Alimentos de los EUA (FDA) y los ha convertido en ingredientes ampliamente utilizados en la industria de bebidas y alimentos. En la Tabla 1 se muestra un resumen de sus aplicaciones.

Tabla 1. Algunos usos de las inulinas en la industria alimentaria.*

Aplicación	Funcionalidad	Concentración utilizada (%p/p)
Productos lácteos	Reemplazan al azúcar y la grasa, son sinérgicos con edulcorantes, dan textura y cuerpo, fuente de fibra dietética y prebióticos, estabilidad en la formación de espuma	2-10
Postres congelados	Reemplazan al azúcar y la grasa, mejoran textura y evitan derretimiento, sinérgicos con edulcorantes, fibra dietética y prebiótico	2-10
Alimentos untables	Mejoran textura y “untabilidad”, estabilizan emulsiones, fibra dietética y prebiótico, Reemplazan grasa	2-10
Pan y alimentos horneados	Fibra dietética y prebiótico, reemplazan grasa y azúcar, mejoran la retención de humedad	2-15

Cereales para desayuno	Fibra dietética y prebiótico Los hacen más crujientes y menos densos	2-25
Rellenos	Mejoran textura, reemplazan azúcar y grasa	2-30
Aderezos para ensalada	Dan textura y cuerpo Reemplazan grasa	2-10
Preparaciones con frutas	Reemplazan azúcar Sinérgicos con edulcorantes Dan textura y cuerpo Fibra dietética y prebiótico	2-10
Productos cárnicos	Fibra dietética Reemplazan grasa Textura y estabilidad	2-10
Chocolate	Reemplazan azúcar Fibra dietética Dan resistencia al calor	5-30
Productos dietéticos	Reemplazan azúcar y grasa Sinérgicos con edulcorantes Dan textura y cuerpo Fibra dietética y prebiótico Bajo valor calórico	2-15

* Franck, 2002.

Además de sus usos en la industria alimentaria, se ha probado en recientes investigaciones que la inulina y los FOS son también útiles en aplicaciones biomédicas. En el caso de la inulina de achicoria, la propiedad de formar geles permite que sea utilizada para controlar la liberación de medicamentos que deben llegar al intestino grueso (Vervoort y col., 1997); también se ha utilizado para estabilizar y proteger la actividad de drogas y vacunas a base de péptidos durante procesos de secado o congelación (Hinrichs y col., 2001) y se ha demostrado que las partículas cristalinas de inulina de alta masa molecular actúan como coadyuvantes de algunas vacunas al incrementar la respuesta inmunológica de los organismos (Barclay y col., 2010).

2.4. Síntesis de las fructanas

Las plantas y los microorganismos que producen fructanas, lo hacen a partir de sacarosa mediante reacciones enzimáticas que involucran a las fructosiltransferasas (FTFs). Estas enzimas pueden transferir los residuos fructosilo de una molécula de sacarosa a una molécula receptora que puede ser sacarosa, glucosa o fructosa, una cadena de fructosas, agua o incluso otro tipo de aceptores con una función alcohol (Ortíz-Soto, 2004). En la Figura 3 se esquematiza el mecanismo de las FTFs. La energía que se desprende de la hidrólisis del enlace glicosídico de la sacarosa se emplea para lograr la síntesis del enlace fructosilo, de modo que la reacción no requiere de cofactores ni intermediarios de alta energía (Velázquez y col., 2009).

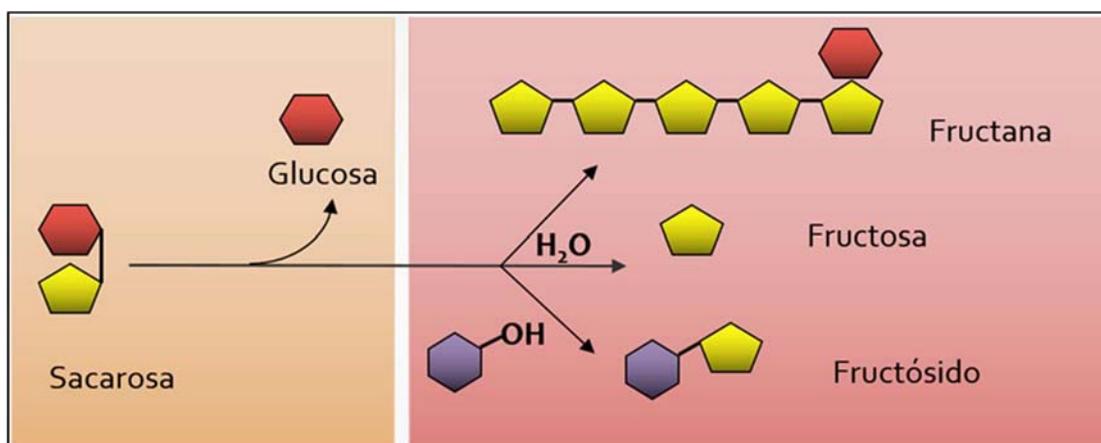


Figura 3. Mecanismo de síntesis de las fructanas mediante fructosiltransferasas. Usando sacarosa como sustrato, las FTFs son capaces de liberar la glucosa y transferir la fructosa a una fructana en crecimiento, a una molécula de agua o a una molécula de otro compuesto.

Las FTFs tienen la habilidad de ser regioselectivas y quimioespecíficas, es decir, son capaces de enlazar el residuo fructosilo que transfieren en una posición específica del aceptor y con un enlace determinado. De esta manera, pueden clasificarse como levansacarosas o inulosacarosas si sus productos poseen principalmente enlaces $\beta(2-6)$ o $\beta(2-1)$ respectivamente.

2.4.1. Fructosiltransferasas de plantas

En las plantas, las fructanas se sintetizan por la acción de dos o más enzimas que pueden formar cadenas relativamente largas (de entre 65 a 250 unidades) y ramificaciones diversas. La primera reacción que se lleva a cabo para la formación de inulina es la síntesis de un trisacárido (1-kestosa) por la enzima Sacarosa:Sacarosa 1-fructosiltransferasa, (1-SST) a partir de la transferencia del residuo fructosilo de una molécula de sacarosa a otra. Después, la fructosa:fructosa 1-fructosiltransferasa (1-FFT) interviene alargando la 1-kestosa para formar una cadena de inulina.

Estas enzimas presentan comportamientos inusuales, porque no presentan una cinética tipo Michaelis-Menten; su actividad depende tanto de la concentración del sustrato como de la enzima y esencialmente son no-saturables (Vijn y Smeekens, 1999).

2.4.2. *Fructosiltransferasas de bacterias y hongos*

Las bacterias que producen enzimas capaces de sintetizar inulina o FOS pertenecen solo a unos cuantos géneros, entre los que destacan *Athrobacter* y *Bacillus*. Las bacterias solo requieren de una enzima para producir fructanas, que suele poseer la capacidad tanto de crear nuevas cadenas de fructana directamente a partir de sacarosa, como de alargarlas y ramificarlas también. Un aspecto importante de las inulinas bacterianas es su alto GP en comparación con las de plantas, ya que puede llegar a alcanzar varios miles de unidades de fructosa (Ganaie y col., 2014).

En el caso de los hongos, las enzimas que se han estudiado catalizan principalmente la síntesis de FOS de baja masa molecular (1-kestosa, nistosa, f-nistosa). Generalmente estas enzimas se secretan en cantidades importantes al sobrenadante de los cultivos fungales, suelen ser termorresistentes y tienen rendimientos de entre el 50 y 60% con respecto a la sacarosa en la síntesis de FOS. La mayoría de las enzimas FT fungales descritas pertenecen a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (Ganaie y col., 2014).

2.4.3. *Las Inulinasas*

Las inulinasas son enzimas que se utilizan en la producción de fructanas, mediante la hidrólisis de inulina, de modo que pertenecen a la familia de las Glicosilhidrolasas. Pueden ser producidas por hongos, levaduras y bacterias, aunque estas últimas están menos estudiadas. Pueden ser de tipo exo si tienen la capacidad de hidrolizar los enlaces de los extremos del polímero liberando fructosa, o de tipo endo cuando pueden hidrolizar enlaces internos y liberar FOS (Basso y col., 2010).

Se han encontrado inulinasas en *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Yarrowia*, *Rhizopus*, *Trichoderma* y *Kluyveromyces*. La principal fuente de inulinasas son los hongos, de los cuales incluso algunas especies pueden producir enzimas de tipo endo y exo. A escala industrial se utilizan mayoritariamente endoinulinasas de diferentes cepas de *Aspergillus niger* para preparar FOS a partir de inulina vegetal. Las exoinulinasas por su parte, tienen un nicho importante en la producción de jarabes de alta fructosa (Singh y col., 2016).

2.4.4. Producción de inulina y FOS en la industria

La inclusión de la inulina y los FOS en la formulación de alimentos funcionales y productos farmacéuticos ha ocasionado un gran incremento en la demanda a nivel internacional, que se cubre casi totalmente a partir de la inulina proveniente de plantas. La raíz de achicoria es la fuente más utilizada para su producción, dado que contiene entre 15 y 20% de inulina en peso húmedo (Singh y col., 2010), mientras que en México existe un creciente interés por el estudio y la producción de inulina proveniente de plantas de agave (López y col., 2003).

El proceso general para obtener inulina, así como otros productos de menor tamaño a partir de la raíz de achicoria, se resume en la Figura 4.

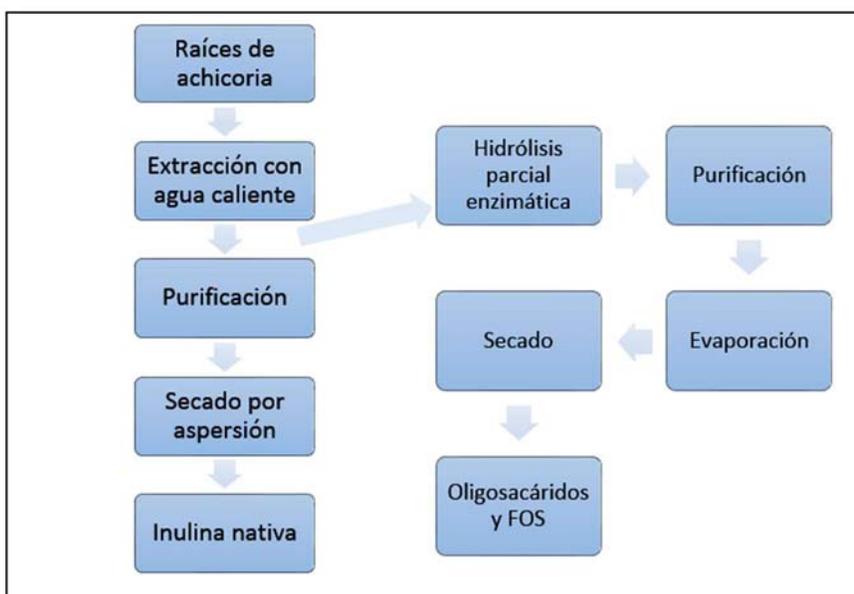


Figura 4. Proceso general para obtener inulina y FOS a partir de raíces de achicoria. Las raíces de achicoria son recolectadas, cortadas y sometidas a un proceso de extracción con agua caliente de modo que se obtiene un jugo. Si el producto final es inulina, el jugo es purificado y secado; si el producto final son FOS u oligosacáridos, es necesaria una hidrólisis antes de la purificación (Franck, 2002).

La alta demanda de estos compuestos ha impulsado la búsqueda de fuentes alternativas de producción que resulten factibles a nivel industrial. Así, la producción de inulina y FOS a través de enzimas es una de las opciones que actualmente se exploran.

Los FOS que pueden encontrarse en el mercado, son obtenidos mediante la hidrólisis parcial de inulina nativa de raíz de achicoria llevada a cabo por endoinulinasas o bien por síntesis directa vía enzimática a partir de sacarosa.

Los procesos enzimáticos en los que se usa sacarosa y una FTF fungal para la producción de FOS, generalmente se llevan a cabo con altas concentraciones del sustrato, debido a que estas enzimas poseen también una actividad hidrolítica que se desfavorece en estas condiciones. Los productos que se obtienen son FOS pequeños (GP 3-6), mayoritariamente del tipo GF_n y requieren una purificación por cromatografía o por filtración en membranas para remover monosacáridos libres (glucosa, cantidades pequeñas de fructosa) y sacarosa sin reaccionar. Además la actividad hidrolítica inherente a la enzima reduce el rendimiento del proceso (Singh y col., 2016).

Por otro lado, como resultado de los procesos en los que se utilizan inulinasas para la hidrólisis de inulina como materia prima, se obtienen FOS más grandes (GP de 2 a 9) y, dado que provienen de largas cadenas de inulina, solo algunos FOS contienen glucosa terminal (Singh y col., 2016) (Figura5).

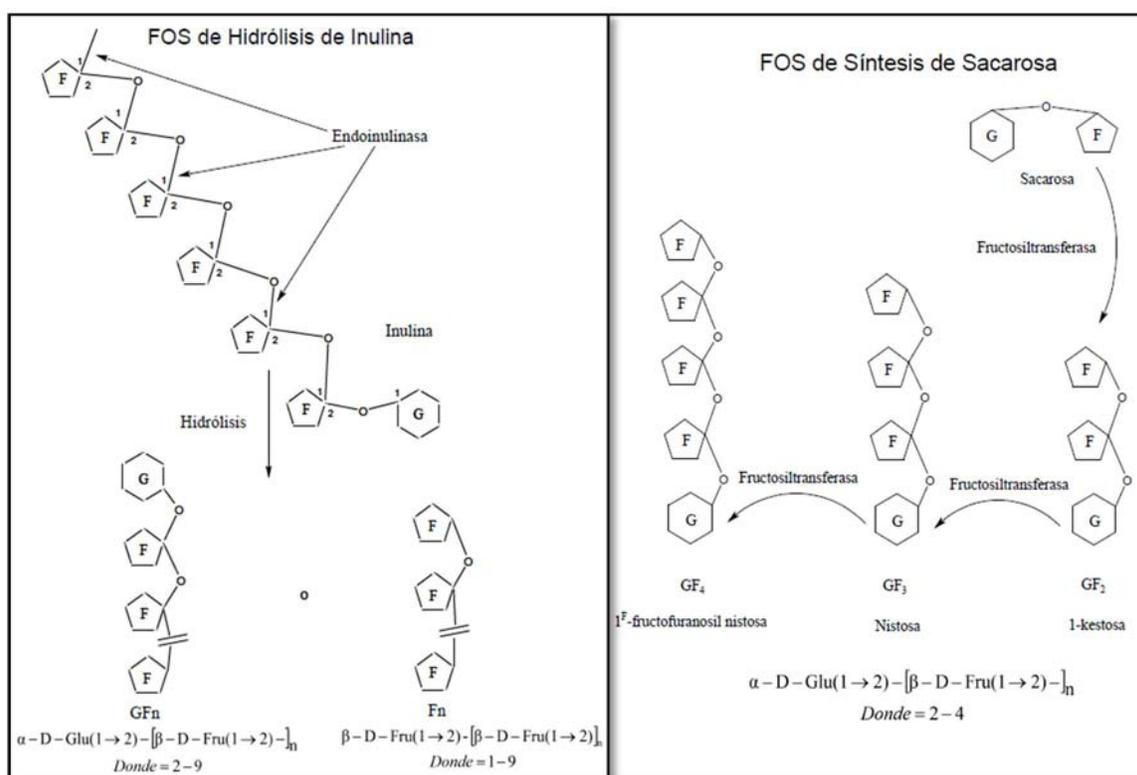


Figura 5. Estructura de los FOS que se producen por hidrólisis de inulina y por síntesis a partir de sacarosa. Del lado izquierdo, con inulina como sustrato y una endoinulinaasa, se pueden obtener FOS de tipo GF_n o Fn. Del lado derecho, con sacarosa como sustrato y una FTF se obtienen FOS de tipo GF_n (Singh y col., 2016).

2.5. La Inulosacarasa (IsIA) de *Leuconostoc citreum*

En el laboratorio de Tecnología Enzimática del IBt, se han hecho múltiples estudios con el objetivo de encontrar enzimas capaces de producir inulina o FOS a partir de sacarosa.

Como parte de estos esfuerzos, se realizó una caracterización bioquímica de una enzima FTF cuya producción se induce con sacarosa en el medio de reacción, además está asociada a la pared celular de la bacteria *Leuconostoc citreum* CW28 y es capaz de producir inulina a partir de sacarosa, es decir una Inulosacarasa (*IsIA*). La bacteria fue identificada de una colección de bacterias lácticas aisladas del Pozol, una bebida fermentada no alcohólica de origen maya que se prepara con maíz nixtamalizado (Olivares-Illana y col., 2002).

Dentro de esta primera caracterización, se determinó que la enzima *IsIA* posee tres dominios catalíticos, lo que ocasiona que tenga una masa molecular de 165 kDa, mucho mayor a los valores que se han reportado para otras FTFs (45 y 64 kDa). Se intentó purificarla a partir de las células completas, pero en este proceso se pierde hasta el 90% de la actividad enzimática. Las condiciones óptimas de reacción encontradas para la producción de inulina con la enzima asociada a las células tanto como solubilizada, incluyen un pH de 6.5 y una temperatura de 30°C. A temperaturas por arriba de los 50°C la enzima presenta desactivación total en 30 minutos en ambos casos (Olivares-Illana y col., 2002).

Posteriormente, se realizó una caracterización molecular del gen de la *IsIA* a partir de la secuencia de péptidos secuenciados de la enzima purificada. La enzima está compuesta de una serie de 1490 aminoácidos (aa) que proviene de un gen perteneciente al ADN genómico de la bacteria y que presenta un contenido de G+C de 37.25%. Los dominios de la enzima fueron delimitados (Figura 5) y comparados con las secuencias de otras glicosiltransferasas (GTFs), familia a la que pertenecen las FTFs. El dominio N terminal de *IsIA* está formado de 138 aa y posee un 40% de similitud con las alternasacarasas, con una región variable no conservada entre las GTFs que parece no tener función evidente. El dominio catalítico de la enzima muestra similitudes de hasta el 56% con levansacarasas microbianas y un centro catalítico de 441 aa que podría estar emparentado con la familia 68 de las Glicosilhidrolasas. También posee una región entre el dominio catalítico y el dominio C terminal, de baja identidad con la alternasacarasa de *L. mesenteroides* NRRL B-1355, que se ha denominado como la “región de transición”. El dominio C terminal de la enzima tiene una identidad de 80% con el mismo dominio de las alternasacarasas, con una posible función de unión a polímeros. Este último consiste de 4 series repetidas no idénticas de aa en tándem. Se expresaron dos versiones truncadas del gen, en una se eliminó solo el dominio C terminal y en la otra de eliminó el C terminal más la región de transición. Las propiedades de ambas enzimas truncadas se compararon con las de la versión completa, demostrándose que las versiones truncadas presentan una mayor velocidad de

reacción, aunque se hicieron más hidrolíticas. También se observó una reducción en el tiempo de vida media a 40°C, lo que sugiere que el C terminal contribuye a la estabilidad de la enzima (Olivares-Illana y col., 2003).

En un estudio posterior se determinaron las mejores condiciones para producir inulina con la IsIA tanto asociada a la pared celular, como solubilizada. Al cultivar las células, se determinó que utilizando una temperatura de incubación de 30°C la enzima sufría una proteólisis que la hacía más hidrolítica, obstáculo que se resolvió al crecer el microorganismo a 20°C, de modo que se conserva tanto la integridad como la actividad transferasa de la enzima. Por otro lado, durante la reacción la enzima presentó mayor actividad transferasa a altas concentraciones de sacarosa, de manera que, para minimizar la actividad hidrolítica debe emplearse una concentración de sacarosa mayor a 200 g/L. Se observó que la enzima asociada a las células produce inulina de una masa molecular promedio de 3000 kDa mientras que la enzima solubilizada puede producir adicionalmente oligosacáridos e inulina de menor masa molecular (0.4 a 7.4 kDa) (Ortíz-Soto, 2004). Las marcas comerciales de inulina vegetal presentan masas moleculares de entre 5 y 11 kDa según la presentación (Roberfroid, 2007), de modo que, la inulina de *L. citreum* tiene una masa molecular mucho mayor que las inulinas comerciales.

En experimentos llevados a cabo a nivel de planta piloto para la producción de inulina, se optó por emplear la enzima asociada a la pared celular, dado que las células son más densas y por lo tanto más fáciles de recuperar al final de proceso y, como ya se mencionó, al solubilizarla se pierde un porcentaje muy importante de la misma. Se cultivaron células a 20°C que fueron recuperadas por centrifugación y se usaron como biocatalizador. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 30 L con una concentración de sacarosa de 250 g/L, en una solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 6.5. Se usó una actividad enzimática de 0.7 U/mL a una temperatura de 30°C durante 40 horas, en las que se logró convertir el 84% del sustrato (aprox. 210 g/L de sacarosa). En estas condiciones se alcanzó una alta viscosidad debida al polímero y se requirió de una centrifugación intensa para recuperar el biocatalizador del medio de reacción. Enseguida el polímero pudo ser separado del medio de reacción mediante precipitación con etanol industrial (2:1), para posteriormente recuperarlo por centrifugación y por último secarlo. El producto seco pudo cuantificarse, dando como resultado una producción de 80 g de inulina por litro de medio de reacción (Ortíz-Soto, 2004).

En un trabajo posterior, con el fin de entender como intervienen los dominios catalíticos de la *IsIA*, se construyeron más versiones truncadas que fueron caracterizadas cinética y bioquímicamente (Del Moral, 2008). La versión completa y las truncadas construidas se presentan en la Figura 6.

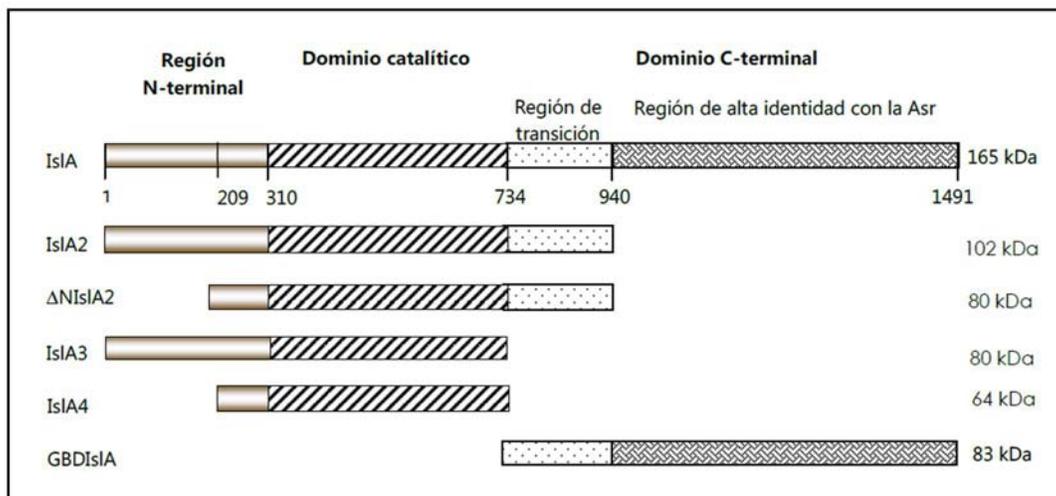


Figura 6. Esquema del gen de la inulosacarasa de *L. citreum* *IsIA* y sus versiones truncadas (Del Moral, 2008).

En la Tabla 2 se muestran algunos de los resultados obtenidos por Del Moral (2008) en el estudio de caracterización cinética y bioquímica de las versiones truncadas de la enzima.

Tabla 2. Resultados del estudio de caracterización fisicoquímica y cinética de *IsIA* y sus versiones truncadas.

Versión de la Enzima	Vida media 35°C (min)	Temperatura óptima (°C)	pH óptimo	Polímero de alto PM	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	Hidrólisis/Transferencia*
<i>IsIA</i> solubilizada	420±10	40	6.5	Si	38	25	40/60
<i>IsIA2</i>	407±22	40	6.5	Si	24	28.2	38/62
$\Delta NIsIA2$	60±15	35	6.5	NR	18	29.6	45/55
<i>IsIA3</i>	346±16	28	6.3	Si	NR	NR	61/39
<i>IsIA4</i>	128±18	25	6.3	Si	142	105	70/30

NR: no reportado

*Con 100 g/L de sacarosa en reacciones de 16 h

Según los resultados obtenidos en este estudio, el dominio C terminal de la enzima es responsable del anclaje a la pared celular de *L. citreum*, mientras que el dominio N terminal ayuda a estabilizar a la enzima junto con la región de transición y ésta última participa en su especificidad hacia la hidrólisis o la transferencia. Por otro lado, la región de transición también se relaciona más

directamente con la afinidad de la enzima al sustrato y la velocidad de reacción, de modo que parece probable que esta región tenga interacción con el sitio catalítico (Del Moral, 2008).

Por último, se realizaron pruebas con la versión truncada *IsIA4*, encontrando que produce FOS. Se analizaron las condiciones óptimas para producirlos a partir de sacarosa y se determinó que con una concentración de sacarosa alta (700 g/L) y bajas concentraciones de enzima (1 U/mL) la especificidad hacia la transferencia podía llegar hasta 70%, mientras que a menores concentraciones de sacarosa o mayores concentraciones de enzima se favorecía la hidrólisis. El perfil de productos de la reacción que favorece la transferencia, (Figura 7) mostraba compuestos con un GP de entre 3 y hasta 25 unidades además de una fracción de polímero de alta masa molecular (Peña, 2013).

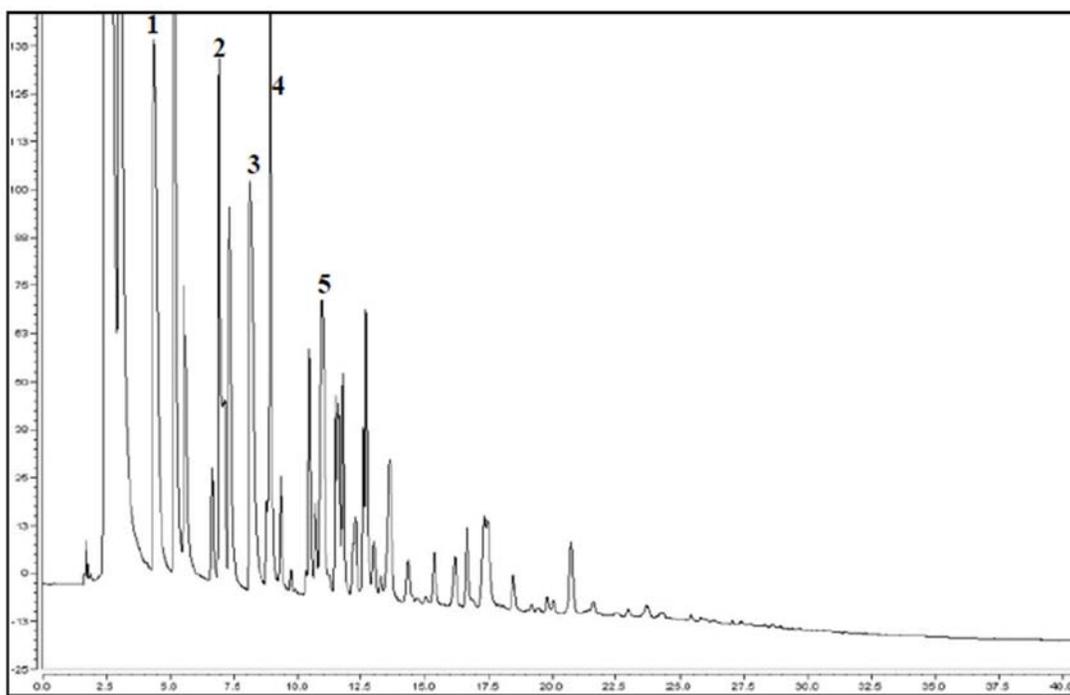


Figura 7. Perfil de FOS obtenido en cromatógrafo de intercambio iónico de alta eficiencia acoplado a pulsos amperométricos (HPAEC-PAD) que se producen con la versión truncada *IsIA4*. 1) 1-kestosa, 2) 6-kestosa, 3) neo-kestosa, 4) nistosa y 5) f-nistosa (Peña, 2013).

2.6. La endoinulinasa Novozym 960©

Novozym 960© es un extracto enzimático producido en fermentación sumergida por *Aspergillus niger* que contiene una endoinulinasa (E.C. 3.2.1.7), es decir una enzima que hidroliza los enlaces internos de la inulina. La endoinulinasa purificada tiene una masa de 68.1 kDa, sus condiciones óptimas de reacción son pH de 6.0 y temperatura de 60°C usando inulina de achicoria (GP 60) como sustrato. En estas condiciones presenta una buena termoestabilidad y una vida media superior a

100 h, además tiene un comportamiento tipo Michaelis-Menten con una K_m de 3.53 mM y una V_{max} de $667 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$. Los productos de la reacción de hidrólisis son inulotriosa (F_3), inulotetraosa (F_4) e inulopentosa (F_5) principalmente, además de trazas de monosacáridos y sacarosa. Estos productos fueron identificados mediante el uso de HPLC con una columna Prevail-Carbohydrate y una fase de acetonitrilo:agua (73:27), en la Figura 8 se observa el perfil de productos obtenido (Mutanda y col., 2008).

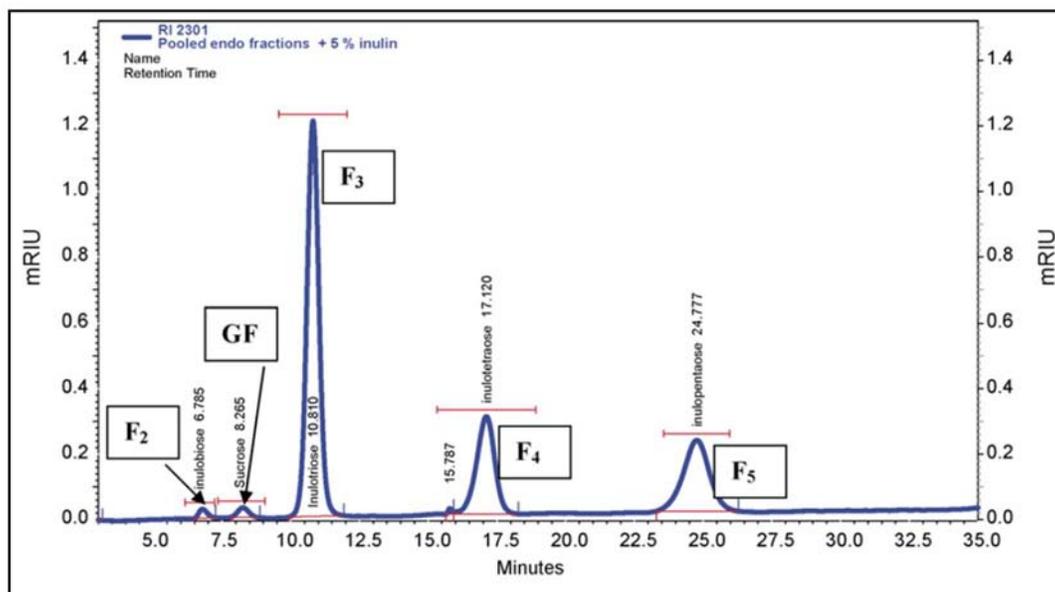


Figura 8. Perfil de FOS de la hidrólisis de Novozym 960 sobre inulina vegetal obtenido mediante HPLC con columna Prevail-Carbohydrate y una fase de acetonitrilo:agua (75:25): F₂) inulobiosa, GF) Sacarosa, F₃) Inulotriosa, F₄) inulotetraosa, F₅) inulopentosa (Mutanda y col., 2008).

En estudios preliminares realizados en el laboratorio de Tecnología Enzimática se probó la capacidad de la endoinulinasa comercial Novozym 960©, para hidrolizar la inulina de *L. citreum* y obtener FOS. Se utilizaron 15.2 U/mL para la reacción con un sustrato de concentración 1% p/v en 23 horas. Se definió que la reacción puede llevarse a cabo a un pH de 6.0 y una temperatura de 50°C con baja agitación (350 rpm). Se observó que esta endoinulinasa actuaba eficientemente sobre la inulina de *L. citreum*, pero que su actividad era mínima o nula sobre las agavinas (Maturano, 2013).

3. JUSTIFICACIÓN

La demanda creciente de FOS ha impulsado la diversificación de los procesos de producción. El uso de enzimas es una de las vertientes posibles para lograr un proceso eficiente. En este trabajo se plantea llevar a cabo la producción de FOS mediante la acción simultánea de las dos enzimas: la inulosacarasa asociada a pared celular de *Leuconostoc citreum* CW28 y la endoinulinasa comercial Novozym 960© producida por *Aspergillus niger*. El propósito es determinar si es posible obtener un proceso diferente para producir FOS usando la actividad combinada de ambas enzimas, dado que las temperaturas óptimas que presentan son muy diferentes (30 y 60 °C respectivamente), y analizar el perfil de productos que se produzca en la misma.

4. HIPÓTESIS

La combinación de las actividades de la Inulosacarasa de *L. citreum* y la endoinulinasa Novozym 960© en una reacción simultánea con sacarosa como sustrato, controlando la velocidad y el tiempo de reacción de las enzimas, permitirá producir una mezcla de FOS con un perfil asociado a la combinación de ambas actividades y de mayor diversidad estructural que los existentes.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Definir las condiciones más favorables y la factibilidad de producir FOS a partir de sacarosa mediante un sistema bi-enzimático compuesto de células completas de *L. citreum* y la endoinulinasa Novozym 960©.

5.2. Particulares

- Revisar las condiciones que se conocen como óptimas para la producción y uso de las células completas de *L. citreum* con actividad inulosacarasa, para ser utilizadas en la síntesis de inulina (Ortiz-Soto, 2004) y definir las mejores condiciones para su almacenamiento.
- Definir las condiciones, propiedades bioquímicas y cinéticas de la endoinulinasa comercial Novozym 960© para producir FOS a partir de inulina microbiana, así como analizar el perfil de productos (FOS) que resultan de la hidrólisis.
- Estudiar la cinética de la reacción catalizada simultáneamente por la inulosacarasa de *L. citreum* y la endoinulinasa de Novozym 960© a partir de sacarosa.
- Analizar el tipo y estructura de los FOS obtenidos en el proceso simultáneo de síntesis que se obtengan en reacciones donde se module la relación de actividades de las enzimas y el tiempo de reacción.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental fue dividido en tres fases:

- a) Producción y caracterización de la enzima *Is/A* asociada a la pared celular de *L. citreum*. Producción de las células, revisión de las condiciones óptimas de producción de inulina, determinación de las mejores condiciones de almacenamiento de las células y estudios de estabilidad operacional de la enzima.
- b) Caracterización de la enzima endoinulinasa Novozym 960®. Análisis de la actividad y el perfil de productos empleando como sustrato la inulina de *L. citreum*.
- c) Estudio de la reacción bi-enzimática (*Is/A*-endoinulinasa). Definición de las condiciones óptimas de reacción conjunta. Caracterización de los FOS obtenidos en función de las condiciones de reacción.

6.1. Caracterización enzimática

6.1.1. Determinación de actividad enzimática global

Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que produce un μmol de producto en un minuto. En el caso de las FTFs, una forma rápida de medir la **actividad global** que incluye la actividad transferasa y la hidrolítica es a través de la cuantificación de la liberación de azúcares reductores (AR). La actividad determinada así sirve de referencia para estudios comparativos pues no es una medición precisa. Una evaluación directa requiere por un lado la medición de la desaparición de sacarosa y por el otro de aparición de FOS vía HPLC, pero no existe un solo producto definible.

Esta determinación se realizó mediante el método de ácido 3, 5 dinitrosalisílico (DNS) (Miller, 1959). Se generó una curva estándar (con pendiente m_{STD}), con soluciones equimoleculares de glucosa y fructosa en concentraciones de 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 g/L que se utilizó después para calcular la actividad de la enzima.

Para realizar pruebas de **actividad global de la inulosacarasa**, se utilizaron células cosechadas y resuspendidas en amortiguador de fosfatos. La reacción se llevó a cabo a 30°C y 1000 rpm en tubos Eppendorf de 1.5 mL, con muestras de 50 μL de suspensión de células, 100 μL de sacarosa en solución (600 g/L) y 450 μL de solución amortiguadora de fosfatos (50 mM, pH 6.5) para completar un volumen de reacción de 600 μL .

Para medir la **actividad de la endoinulina**, se usaron tubos Eppendorf de 1.5 mL y como condiciones de reacción 50°C y 1400 rpm. Se colocaron 500 µL de inulina de achicoria (HP de Orafiti) diluida en amortiguador de acetatos 100 mM pH 6.0 y 10 µL de preparado enzimático Novozym 960©, diluido en el mismo amortiguador 1 a 40 (v/v).

Se tomaron muestras de 50 µL a los 0, 2, 5, 7 y 10 minutos, que se mezclaron con 50 µL de DNS en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Las muestras se calentaron en agua en ebullición por 5 minutos y luego se diluyeron con 500 µL de agua destilada. Se leyó la absorbancia de las muestras a 540 nm utilizando como blanco el tiempo inicial (tiempo 0). Las muestras fueron diluidas, en caso de ser necesario, para poder tener lecturas confiables en el espectrofotómetro (valores de 0.1 a 0.9). Se obtuvo una gráfica con los datos obtenidos (tiempo vs. absorbancia), y a partir de ésta, la pendiente (m_x) de la recta ajustada. Se utilizaron las siguientes ecuaciones para calcular la velocidad (v_i) de la reacción:

$$\frac{m_x \left(\frac{\text{Absorbancia}}{\text{min}} \right)}{m_{STD} \left(\frac{\text{Absorbancia}}{\text{mg AR/mL}} \right)} = v_i \left(\frac{\text{mg AR}}{\text{min} * \text{mL}} \right)$$

La velocidad puede entonces convertirse en unidades de actividad enzimática:

$$v_i \left(\frac{\text{mg AR}}{\text{min} * \text{mL}} \right) * \left(\frac{1 \text{ mmol}}{180 \text{ mg AR}} \right) * \left(\frac{1000 \mu\text{mol}}{1 \text{ mmol}} \right) * \left(\frac{\text{vol. de reacción } \mu\text{L}}{\text{vol. de muestra } \mu\text{L}} \right) * (FD) = \frac{U}{\text{mL}} \text{ ó } \frac{\mu\text{mol AR}}{\text{min} * \text{mL}}$$

Donde FD corresponde al factor de dilución empleado en las muestras, para lectura en el espectrofotómetro.

6.5.1. Determinación de las tasas de hidrólisis y transferencia de las enzimas

En el caso del **extracto enzimático Novozym 960 con inulina como sustrato**, debido a que la inulina de *L. citreum* está compuesta casi completamente por fructosa, el rendimiento de FOS está relacionado con la hidrólisis de la misma y la liberación de fructosa al medio de reacción, de modo que se utilizaron las siguientes ecuaciones para determinar el rendimiento de FOS:

$$\% C_I = \left(\frac{I_i - I_f}{I_i} \right) * 100$$

$$\% Fru_l = \left(\frac{Fru}{I_i - I_f} \right) * \% C_I$$

$$\% FOS = \% C_I - Fru_l$$

Donde, $\% C_i$ es el consumo de inulina, I_i y I_f se refieren a la inulina al inicio y final de la reacción respectivamente (en mM de equivalentes de fructosa) y Fru_l es la cantidad de fructosa liberada al medio (mM).

En el caso del **extracto enzimático Novozym 960 sobre sacarosa y de la reacción donde se utilizan el extracto de Novozym 960 y la IsIA simultáneamente sobre sacarosa**, las tasas de hidrólisis (%H) y transferencia (%T) se calcularon en base a la sacarosa que se consumió en la reacción (S_c , mM) y la liberación de fructosa al medio de reacción (Fru_l , mM):

$$\% S_c = \left(\frac{S_i - S_f}{S_i} \right) * 100$$

$$\% H = \left(\frac{Fru_l}{S_i - S_f} \right) * \% S_c$$

$$\% T = \% S_c - \% H$$

Donde S_i y S_f son sacarosa inicial y final (mM).

6.2. Células de *Leuconostoc citreum*

6.2.1. Producción de las células

Para la realización de este trabajo se utilizó una alícuota de la cepa de *L. citreum* CW28 almacenada en glicerol al 40% a -20°C del cepario del laboratorio.

Para la producción de células se utilizó medio *Leuconostoc* (Lm) con la composición que se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición del medio de cultivo Lm*

	Compuesto	Concentración (g/L)
Fuente de carbono	Sacarosa	20
Fuente de nitrógeno	Extracto de levadura (BD Nutrients)	20
Amortiguador	Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	20
Ajuste pH	Ácido clorhídrico (HCl)	
Sales	Sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2
	Cloruro de calcio ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.05
	Sulfato Ferroso ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.01
	Sulfato de manganeso ($MnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.01
	Cloruro de sodio (NaCl)	0.01

* Maturano, 2014

Las fermentaciones se llevaron a cabo en una incubadora New Brunswick Scientific. Todas las lecturas de Densidad Óptica (DO) relacionadas con el crecimiento del microorganismo, se realizaron en un espectrofotómetro Beckman DU650 a 600 nanómetros (nm). Las muestras se diluyeron con agua destilada en proporción 1:10 para tener medidas de DO de entre 0.1 y 0.9, este factor se tomó en cuenta para reportar todas las DO.

Para producir las células se pre-inocularon 25 mL de medio al 1% v/v con la alícuota de células en glicerol. Se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL a 200 rpm y 30°C por hasta 14 horas, cuando alcanza una DO de por lo menos 7.5, correspondiente al inicio de la fase estacionaria del cultivo.

Para la etapa de crecimiento del microorganismo, se tomó como inóculo una alícuota del pre-inóculo a una concentración de 2% v/v con respecto al medio estéril, bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación. En esta etapa, cuando el cultivo alcanzó una DO correspondiente a la parte final de la fase exponencial, es decir entre 5.5 y 6.5, se tomaron alícuotas de 500 μ L del medio a las que se adicionó glicerol 80% en proporción 1:1 para ser almacenadas a -80°C. Para caracterizar la etapa de crecimiento de las células, se tomaron muestras de 1 mL cada hora hasta llegar a la fase estacionaria, a las cuales se determinó DO, pH, contenido de monosacáridos y sacarosa.

Al alcanzar la fase estacionaria, el medio fue centrifugado en un equipo Beckman Coulter a 9282 x g por 15 minutos a 4°C. Las células separadas del sobrenadante se lavaron dos veces con solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 6.5, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo las células después de cada lavado. Al final las células se resuspendieron en la menor cantidad posible de amortiguador y se determinó su actividad enzimática, como se explica en el apartado 6.2.1 de este trabajo.

6.2.2. Pruebas de estabilidad en almacenamiento

Con el fin de determinar la estabilidad de las células bajo diferentes condiciones de almacenamiento, se produjeron tres lotes de células que fueron separadas en tres grupos: la primera fracción de células se almacenó en congelación a -20°C en alícuotas de 100 μ L en tubos Eppendorf, de modo que las muestras descongeladas no volvieron a congelarse; la segunda fracción se colocó en tubos Eppendorf en alícuotas de 1 mL y se mantuvo a 4°C; la tercera fracción de células se congeló con hielo seco sobre las paredes de tubos Falcon de 50 mL y fue liofilizada.

Se determinó la actividad global de cada lote por triplicado, valor que fue tomado como el 100% de la actividad de cada lote. Se realizaron pruebas semanales para determinar la actividad remanente de las células almacenadas mediante cada uno de los tres métodos.

En el caso de las células liofilizadas la cantidad de células pesadas y la relación entre las células liofilizadas y las que se encontraban en solución se tomó en cuenta para los cálculos de actividad enzimática global.

6.2.3. Producción polímero

Para la producción de polímero con la IslA, se utilizó una solución patrón de sacarosa 600 g/L en amortiguador de fosfatos de 50, 200 y 300 mM o acetatos 300 mM y pH 6.5. Las reacciones se llevaron a cabo en volúmenes de 1 mL, con un termomixer Eppendorf para tubos de 1.5 mL a 30°C y 1000 rpm. El pH de las muestras fue verificado con tiras indicadoras de pH 0-14 de Merck. Se definió el tiempo de cada reacción como el tiempo necesario para convertir por lo menos el 90% de la concentración inicial de la sacarosa. Este cálculo se realizó a partir de la ecuación integrada de Michaelis-Menten:

$$t = \frac{S_o * X - K_m * \ln(1 - X)}{V_{max}}$$

Donde:

t = Es el tiempo (min) necesario para llegar a la conversión X

S_o = Concentración inicial de sacarosa (mM)

X = Fracción de la conversión (0.9 en este caso)

K_m = 66 mM de sacarosa en las células completas (Ortíz-Soto, 2004)

V_{max} = Las unidades enzimáticas utilizadas por unidad de volumen de reacción

6.2.4. Pruebas de estabilidad operacional

Se colocaron tres reacciones de 5 mL en viales de vidrio en un termomixer Eppendorf, a 30°C y 1000 rpm durante ciclos de 3 horas. Se utilizaron 5 U/mL de células liofilizadas y 250 g/L de sacarosa en amortiguador de acetatos 0.3 M pH 6.5. Después de cada ciclo las células fueron recuperadas por centrifugación por 15 minutos a 9282 x g a 4°C, se tomó una muestra del sobrenadante para

cuantificar inulina y las células fueron lavadas dos veces con el mismo amortiguador. Se midió la actividad remanente en las células después de cada ciclo.

6.3. Propiedades cinéticas de Novozym 960

Se determinaron las constantes cinéticas de la endoinulinasa con la inulina de *L. citreum* como sustrato de la enzima, a una temperatura de 30°C en amortiguador de acetatos 300 mM pH 6.5. Para determinar la velocidad inicial de reacción (v_i) se utilizó un rango de concentraciones de inulina desde 1 hasta 60 g/L y 25 U/mL (150 μ L diluidos 1:10 en el amortiguador) de Novozym 960. Las velocidades iniciales se midieron por medio de la liberación de AR, de manera similar a la determinación de actividad inulosacarasa, a partir de reacciones de 1 mL en tubos Eppendorf de 1.5 mL, en un termomixer Eppendorf a 1000 rpm. Los cálculos para determinar los parámetros se realizaron mediante el software Solver de Excel 2013.

6.3.1. Efecto de la temperatura sobre Novozym 960

Se determinó el efecto de la temperatura sobre la actividad de Novozym 960, con inulina de achicoria e inulina bacteriana, en una concentración de 50 g/L en amortiguador de acetatos 300 mM pH 6.5 y 10 μ L de enzima diluida 1:40 en el mismo amortiguador.

6.4. Producción de FOS

Los ensayos de producción de FOS se realizaron con Novozym 960 e inulina como sustrato, o ISIA y Novozym 960 con sacarosa como sustrato. Se utilizó solución amortiguadora de acetatos 300 mM a pH 6.5. Las reacciones se llevaron a cabo en viales de vidrio de 7 mL, con volúmenes de reacción de 3 mL a 30°C y 1000 rpm en un termomixer Eppendorf para tubos de 15 mL. Se estableció un tiempo de reacción de al menos tres horas, acorde con los tiempos de las reacciones de síntesis de polímero.

6.6. Análisis de productos de reacción

Todas las muestras de reacción fueron congeladas en hielo seco para detener la reacción inmediatamente después de tomarse. Las enzimas fueron desactivadas calentando las muestras en agua en ebullición por 10 minutos. Se centrifugaron por 10 minutos a 20160 x g en una centrífuga Eppendorf 5424 y el sobrenadante se pasó por filtros de nylon para jeringa de 0.2 μ m. Las muestras fueron diluidas con agua ultrapura según los requerimientos de los equipos. Se utilizaron como estándares soluciones de Fructosa, Manitol, Glucosa y Sacarosa (Sigma Aldrich), inulina de achicoria

(HP de Orafti) y mezclas de FOS tipo inulina (Raftilosa P95 de Orafti) e inulina de *L. citreum* producida en la planta piloto del IBt en 2009.

6.6.1. Cromatografía en capa fina (TLC)

La cromatografía en placa fina (Thin Layer Chromatography, TLC) permite determinar de manera cualitativa la evolución de una reacción. Con éste método es posible comprobar la existencia de FOS en la reacción, así como determinar su GP; hacerse una idea del consumo de la sacarosa en la misma y la aparición de monosacáridos (glucosa y/o fructosa). Para realizarla se utilizaron placas de aluminio cubiertas con gel de sílice Alugram Xtra Sil G con una fase móvil de cloroformo:etanol:ácido acético:agua (3:11:11:1). Las muestras se diluyeron 1:10 con agua destilada y se aplicaron a las placas. Éstas fueron eluidas en una cámara horizontal CAMAG dos veces y luego reveladas con α -naftol y calor. En la Figura 9 se observa una placa con estándares de los principales compuestos que se pueden determinar con este método.

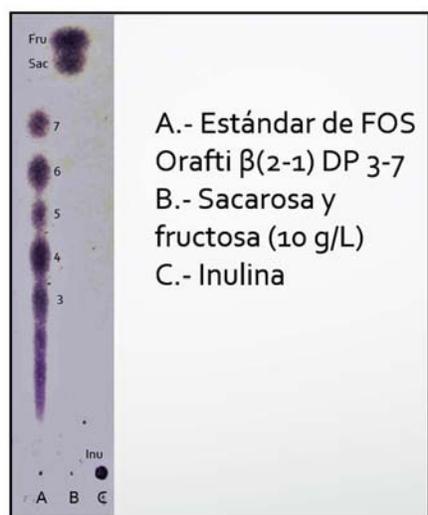


Figura 9. Una placa TLC con estándares de FOS, sacarosa, fructosa e inulina.

6.6.2. Cuantificación de sacarosa, fructosa y glucosa

Para cuantificar de manera precisa las cantidades de fructosa, manitol, glucosa y sacarosa contenidas en las muestras de la reacción, se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta presión (HPLC Waters 717). La determinación se realizó con una columna Prevail carbohydrate ES 5 μ m, usando como fase móvil una mezcla 70:30 de acetonitrilo (grado reactivo) y agua, con un flujo isocrático de 1 mL/min. Las muestras se diluyeron 1:10 con agua. En la Figura 10, un cromatograma típico de estándares de fructosa, glucosa y sacarosa.

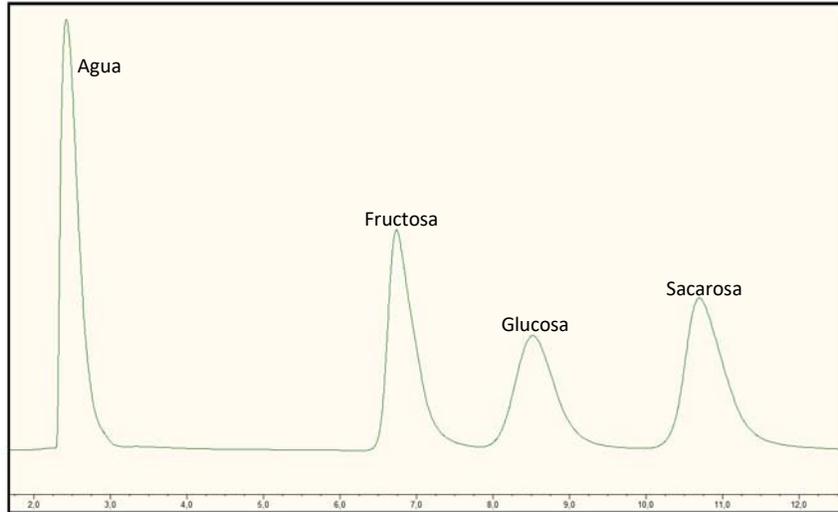


Figura 10. Cromatograma de un estándar de una solución de 10 g/L de fructosa, glucosa y sacarosa en la columna Prevail con acetonitrilo:agua (70:30).

6.6.3. Cromatografía de permeación en gel (GPC)

Para determinar la cantidad de polímero que produce la enzima asociada a pared, se utilizó un cromatógrafo Ultimate 3000 Dionex con detección por índice de refracción, con dos columnas en tándem, marca Waters (WAT011545 y WAT011530) con un flujo isocrático de 0.8 mL/min de Nitrato de Sodio (NaNO_3) 0.1 M a 35°C. Se utilizaron estándares de 10 y 50 g/L de inulina de *L. citreum* producida en la planta piloto (2009) con los que se obtuvo una curva estándar para calcular la cantidad de inulina producida en las reacciones. Las muestras se inyectaron sin diluir.

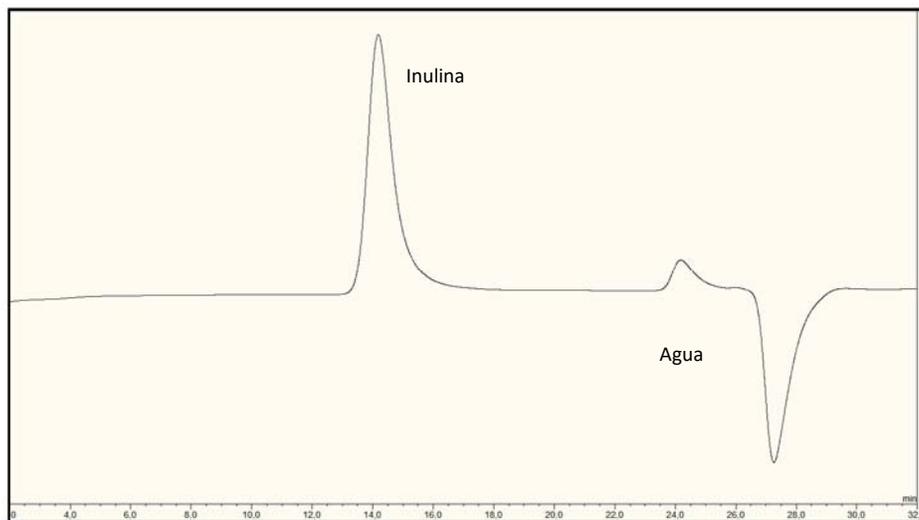


Figura 11. Cromatograma de permeación en gel (GPC) de un estándar de inulina de *L. citreum* a 10 g/L con NaNO_3 0.1 M.

6.6.4. Cromatografía de intercambio iónico (HPAEC-PAD)

En la determinación del tipo de FOS de las reacciones, se utilizó un cromatógrafo de intercambio iónico de alta eficiencia acoplado a pulsos amperométricos (HPAEC-PAD) modelo Ultimate 3000 Dionex con un detector electroquímico ED50 (Dionex) y una columna PA200 para análisis de carbohidratos. Se utilizó una fase de NaOH 150 mM a 30°C en flujo de 0.5 mL/min para equilibrar la columna. Las muestras fueron diluidas 1:100.

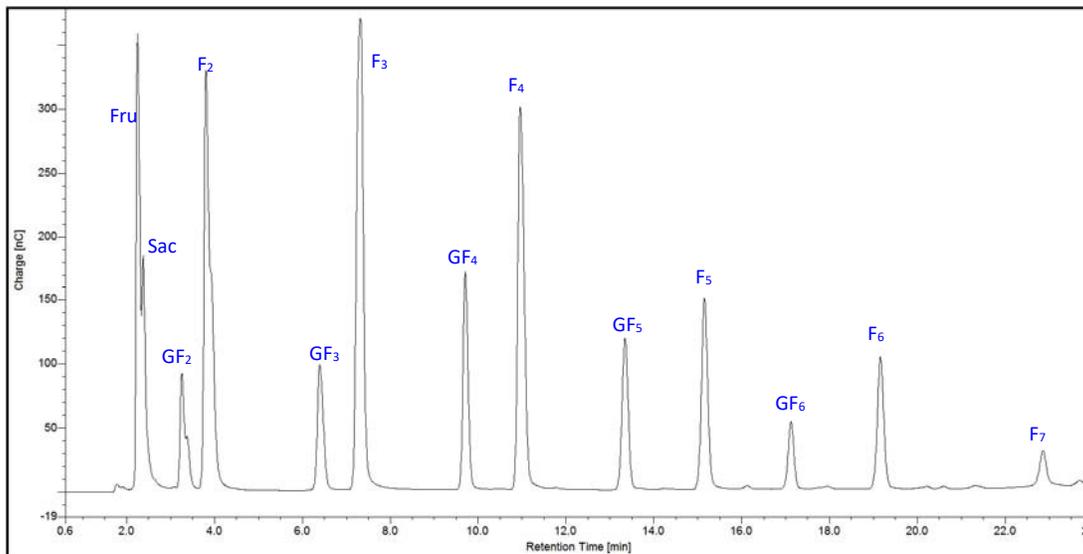


Figura 12. Cromatograma de intercambio iónico de alta eficiencia acoplado a pulsos amperométricos (HPAEC-PAD) de un estándar de FOS tipo $\beta(2-1)$: una mezcla comercial (Raftilosa P95 de Orafiti) de FOS con GP 2 a 7 y estructuras GF_n y F_n.

6.7. Análisis de proteínas

6.7.1. Zimogramas

Los zimogramas son geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) en los que se recupera la actividad de la enzima después de la electroforesis. Para detectar la actividad de la inulosacarasa de *L. citreum* se prepararon geles al 6% y para la endoinulinasa se prepararon geles al 10% que contenían inulina bacteriana con una concentración final de 10 g/L. Las células fueron mezcladas con amortiguador de carga (2x) que contenía SDS al 10% (de modo que fueron lisadas) y luego se cargaron en el gel para ser corridas en una cámara de electroforesis Hoefer Mighty Small II a amperaje constante de 20 mA.

Los carriles correspondientes al marcador de masa molecular y una de las muestras se cortaron y se tiñeron en solución GelCode Blue Stain de Thermo Scientific por 4 o 6 horas y luego se lavaron con agua hasta obtener un fondo claro. El resto de los carriles de cada gel fueron lavados tres veces por

30 minutos con una solución de Tween 80 al 1% (v/v) y solución amortiguadora para renaturalizar la enzima de las muestras. Para la inulosacarasa se incubaron en una solución de sacarosa 100 g/L en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5 mientras que para la endoinulinasa se incubaron en amortiguador de acetatos 300 mM pH 6.5 durante 18 horas a 30°C. Una vez incubados, los geles se lavaron con una solución de etanol:agua (75:25) por 30 minutos para fijar el polímero en el gel. Enseguida los geles fueron tratados con una solución de ácido peryódico 0.7% (p/v) y 5 % de ácido acético 5% (v/v) por una hora para oxidar los grupos hidroxilos del polímero y formar aldehídos. Después se lavaron tres veces por 20 minutos con una solución de 0.2% (p/v) de metabisulfito de sodio y 5 % de ácido acético y por último se les adicionó reactivo de Schiff que al entrar en contacto con los aldehídos genera un colorante purpura insoluble. De esta manera, lo que se tiñe en ambos casos es el polímero y la enzima activa se detectó por la formación polímero (unido a la inulosacarasa) o por halos transparentes (endoinulinasa).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Producción de las células de *L. citreum* CW28

Con el fin de estudiar el comportamiento y estabilidad de la enzima inulosacarasa en las células de *L. citreum* CW28 se revisó el proceso de producción de células completas con actividad inulosacarasa reportado con anterioridad en el grupo de trabajo (Ortiz-Soto, 2004). Para ello, se hicieron ensayos de crecimiento del microorganismo y consumo de sustrato, lográndose reproducir adecuadamente los resultados reportados (Figura 10). Para el cultivo de las células se utilizó una temperatura de crecimiento de 30°C dado que en trabajos recientes se observó que la enzima mantenía la capacidad de producir polímero si la etapa de crecimiento se llevaba a esta temperatura, además de incrementarse la cantidad de células producidas (Maturano, 2014).

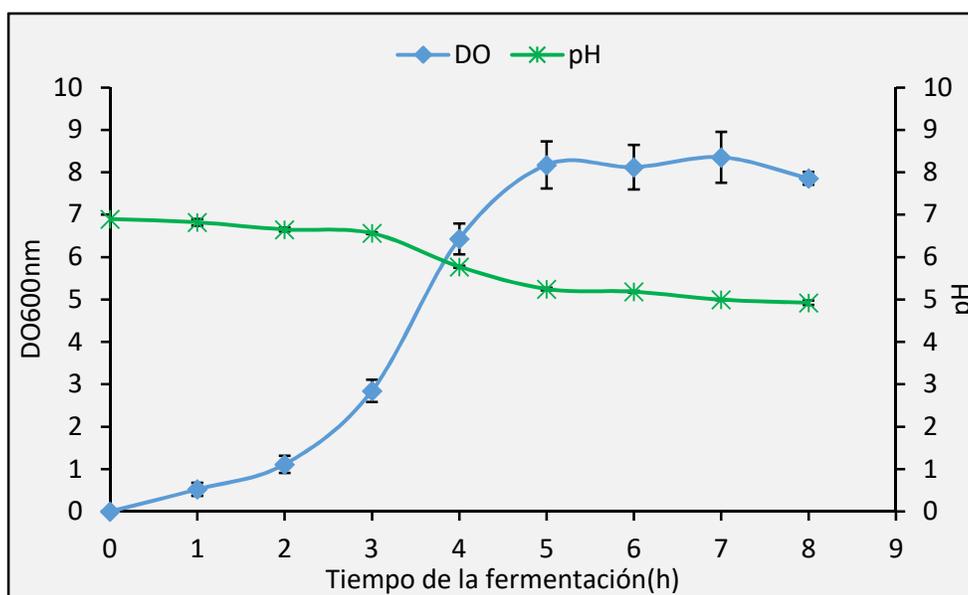


Figura 13. Evolución del cultivo de *Leuconostoc citreum* CW28 en medio Lm a 30°C y 200 rpm. La fase exponencial comienza en la segunda hora de cultivo, y la fase estacionaria empieza después de la quinta hora de cultivo.

La Figura 13 muestra las etapas de crecimiento del microorganismo. La fase estacionaria comienza después de la quinta hora de incubación cuando la sacarosa se termina (Figura 14) y la DO alcanza un valor de 7.5-8.5. Durante el crecimiento del microorganismo, se producen metabolitos que incluyen inulina y ácidos orgánicos, principalmente el láctico y el acético (Maturano, 2014), lo que da como resultado la acidificación del medio, de modo que el pH inicial es de 6.9 y disminuye hasta alrededor de 5.0 (Maturano, 2014; Olivares-Illana, 1998). En general, los valores encontrados coinciden con los datos obtenidos previamente por Maturano (2014) y Ortiz-Soto (2004).

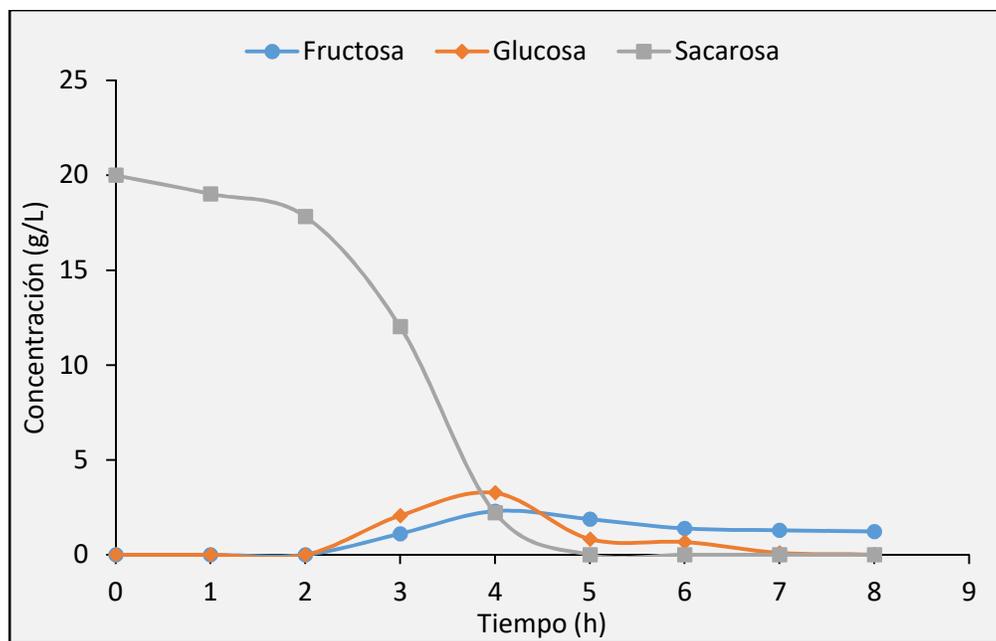


Figura 14. Evolución del consumo de sustrato y liberación de azúcares durante el cultivo de células de *Leuconostoc citreum* CW28 en medio Lm a 30°C y 200 rpm. La caída drástica de la concentración de la sacarosa coincide con la etapa exponencial del cultivo, mientras que la aparición de fructosa y glucosa es evidencia de la actividad de la enzima; la disminución de la glucosa se debe a su uso por la bacteria.

En la Figura 14 se observa cómo cambian los niveles de sacarosa, glucosa y fructosa en el medio conforme se desarrolla el cultivo, particularmente una vez que se inicia la fase de crecimiento exponencial. Puede notarse que la sacarosa se consume totalmente a la quinta hora de la fermentación, coincidiendo con el inicio de la fase estacionaria. La liberación de glucosa al medio evidencia la actividad de la enzima, sin importar el tipo de actividad que predomina (hidrolítica o transferasa). El microorganismo comienza a utilizar la glucosa liberada para mantener su metabolismo, una vez que la sacarosa del medio se termina. El incremento inicial en la concentración de la fructosa se debe a la actividad hidrolasa de la ISIA, cuando la fructosa disminuye se debe en parte a la producción de inulina (Maturano, 2014). Este ensayo sólo se realizó en una ocasión porque los datos que se obtuvieron reprodujeron los obtenidos por Maturano (2014) para el cultivo de *L. citreum*.

Otro de los datos que debían reproducirse con las células de *L. citreum* fue la actividad enzimática global, calculada mediante la liberación de azúcares reductores por el método DNS. En la Tabla 4 se comparan los datos reportados anteriormente por el grupo de trabajo y los obtenidos en este trabajo.

Tabla 4. Comparación de la actividad enzimática en medio Lm alcanzada en el cultivo de células de *L. citreum* CW28

	DO	Actividad (U/mL)
Ortíz-Soto (2004)	7.0	0.89
Maturano (2014)	6.96	0.94
Este trabajo	6.85	0.86

Para hacer una comparación válida, debía asegurarse que la cantidad de células y por tanto de enzima fuera lo más similar posible, razón por la que en la tabla anterior se relacionó la DO del cultivo alcanzada con la actividad global determinada.

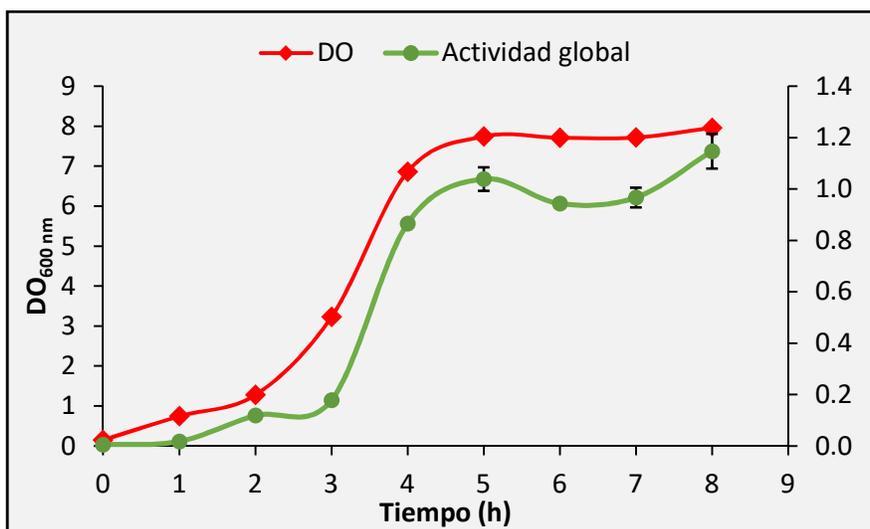


Figura 15. Evolución del crecimiento (DO) y de la actividad global (U/mL) durante el crecimiento de *Leuconostoc citreum* CW28 en medio Lm a 30°C y 200 rpm. La actividad enzimática global que se obtiene está directamente relacionada con la cantidad de células que se producen en el cultivo.

La Figura 15 se obtuvo calculando la actividad global de la enzima de las muestras que se tomaron durante el crecimiento celular. Es evidente que hay una relación directa entre la concentración de células en el medio (DO) y la actividad enzimática, debido a que la enzima está asociada a la pared celular, por lo que en condiciones de inducción la actividad total es directamente proporcional a la cantidad de células que se producen (Olivares-Illana y col., 2003).

7.2. Condiciones de almacenamiento de las células de *L. citreum*

Continuando con los objetivos de este trabajo, se llevaron a cabo pruebas de estabilidad de la enzima, por medio del seguimiento de la actividad enzimática global de las células a través del tiempo. Las células se produjeron y cosecharon al alcanzar una DO aproximada de 7.5 conforme a

la metodología ya descrita, para asegurar una producción importante de células y por lo tanto de enzima. Se procedió a dividir las en tres fracciones para probar tres condiciones de almacenamiento:

a) Células liofilizadas, conservadas a temperatura ambiente.

b) Células suspendidas en solución amortiguadora de fosfatos, refrigeradas a 4°C.

c) Células suspendidas en solución amortiguadora de fosfatos, congeladas a -20°C

Las determinaciones de actividad durante el almacenamiento se realizaron inicialmente de forma semanal, pero se fueron espaciando debido a que no se percibieron cambios drásticos en la actividad global durante las primeras 4 semanas de pruebas. Las determinaciones pudieron realizarse hasta 36 semanas de almacenamiento.

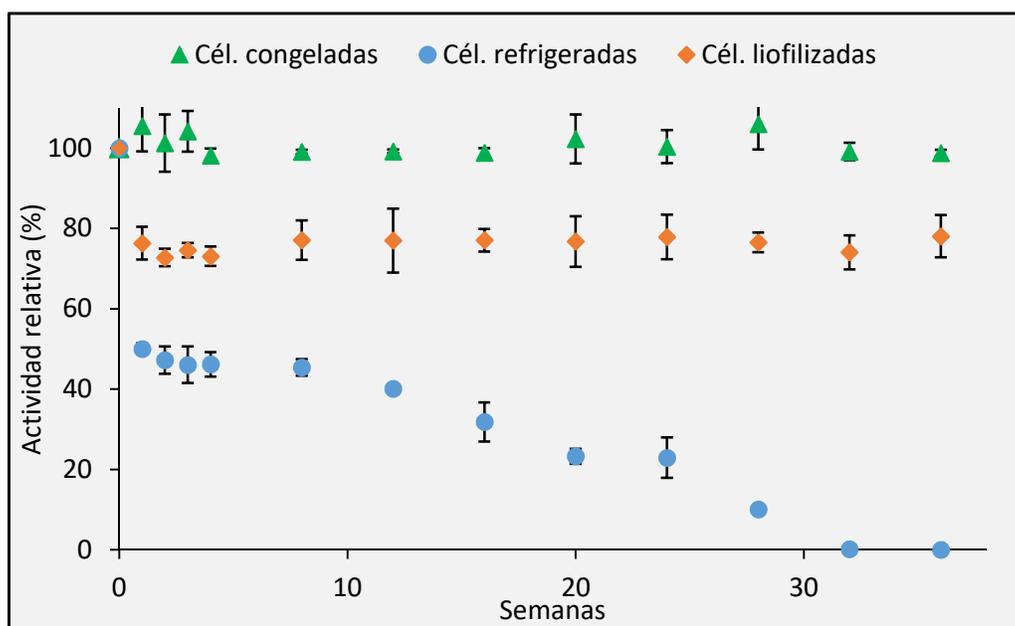


Figura 16. Estudio comparativo de estabilidad de la actividad inulosacarasa en células almacenadas de tres distintas formas. Las células congeladas mantuvieron la actividad global durante el experimento, al igual que las liofilizadas que perdieron alrededor del 25% de actividad con la liofilización. Las células refrigeradas fueron perdiendo actividad durante todo el experimento.

En la Figura 16 se aprecia que la congelación a -20°C es el método que mejor conserva la actividad de la enzima asociada a la pared de *L. citreum*, pues hasta la última determinación realizada en el marco del experimento, la actividad inicial se mantuvo casi en su totalidad. Sin embargo, el mantener las células congeladas a esa temperatura podría no ser viable para una aplicación industrial dados los costos y volúmenes a congelar.

Por otro lado la liofilización es un método de conservación interesante porque aunque las células de este lote perdieron entre 25 y 30% de actividad al ser sometidas a este tratamiento, durante el resto del experimento la actividad se mantuvo prácticamente igual, por lo que este método de conservación podría ser más conveniente que la congelación. Aunque el proceso de liofilización es costoso, podría compensarse con el hecho de que no se necesita equipo de refrigeración para almacenar las células una vez liofilizadas.

Por último, refrigerar las células parece ser el método de conservación menos recomendado, ya que las células pierden alrededor del 50% de actividad al paso de una semana y se sigue perdiendo con el paso del tiempo. Es muy probable que el mismo proceso de inactivación de la enzima pero de forma más acelerada se presente si las células se almacenan a temperatura ambiente.

Para explicar la pérdida de actividad de la enzima en las células en las diferentes condiciones de almacenamiento, se planteó como hipótesis que las células estuvieran vivas después del proceso para cosecharlas, de modo que conservaran capacidad metabólica y siguieran produciendo metabolitos como en la fermentación a partir de la sacarosa que hubieran internalizado antes de sacarlas del medio donde fermentaron, de modo que los ácidos orgánicos que se sabe produce *L. citreum* (Maturano, 2014) disminuyeran el pH de la solución donde se almacenan. Se procedió entonces a analizar el pH de las células en solución con tiras reactivas. En efecto, se encontró que en las células refrigeradas hubo una disminución hasta un pH de 4.0 después de 24 horas de refrigeración. Por otro lado, se sabe que el pH al que esté expuesta la enzima, tiene un efecto importante sobre la actividad de la misma, tanto que a un pH de 4.5 se pierde un 60% de la actividad global (Olivares-Illana, 1998).

En la solución de las células congeladas se mantuvo el pH al cual fueron congeladas (6.5) y hasta por tres semanas una vez descongeladas y almacenadas a temperatura ambiente. Después de este período, el pH comenzó a descender.

En el caso de las células liofilizadas se midió el pH de las células resuspendidas en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5 y se incubaron nuevamente a temperatura ambiente, observándose que el pH se mantuvo constante durante las 6 semanas que se realizó el seguimiento.

Es posible que la liofilización y la congelación tengan un efecto sobre la viabilidad de las células, es decir, que al menos una fracción de las mismas muera de modo que no haya o disminuya la producción de ácidos orgánicos. Sin embargo, es necesario determinar la viabilidad de las células en

cada caso de almacenamiento, además de determinar la cantidad de ácidos orgánicos que pueden producir una vez cosechadas para probar la hipótesis planteada.

7.3. Revisión de las condiciones óptimas para la producción de inulina a partir de sacarosa con la enzima asociada

Con el fin de tener como referencia y sobretodo, para aprender sobre la producción de inulina por la enzima, se verificaron las condiciones de síntesis reportadas como óptimas para la producción de inulina, se realizaron reacciones de síntesis con diferentes concentraciones de sacarosa y células, tomando en cuenta la actividad global calculada anteriormente. La primera prueba se realizó con 100 g/L de sacarosa y 1 U/mL de enzima, con células completas que habían sido congeladas. La reacción se llevó a cabo a 30°C con una agitación de 300 rpm siguiendo la evolución de la misma cada hora hasta la 5ª hora de reacción, tiempo al que se determinó el polímero producido como se describe en la metodología.

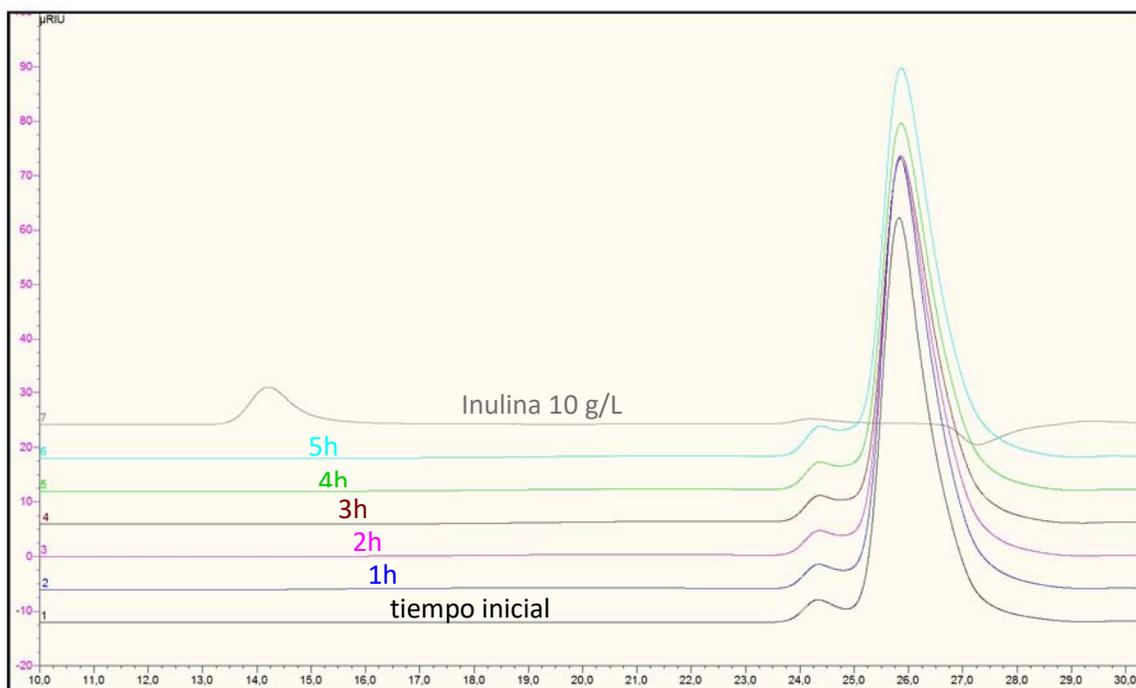


Figura 17. Cromatograma de permeación en gel (GPC) de la reacción de 1 U/mL y 100 g/L de sacarosa. Cada línea representa la muestra a diferentes horas, la línea superior es un estándar de inulina, lo que demuestra que en el resto de las muestras no hay inulina.

En la Figura 17 se muestran los cromatogramas comparativos de la reacción descrita anteriormente. Del lado derecho se observa un pico, que corresponde a monosacáridos y sacarosa. La inulina de *L. citreum* eluye alrededor del minuto 14 en las columnas de GPC (Maturano, 2014) por lo que, como

puede observarse, no hay producción de inulina en esta reacción, lo que resultó desconcertante dado que pudo medirse actividad global en las células antes de ponerlas en la reacción.

Para poder explicar esta situación, se plantearon algunas hipótesis con base en el conocimiento que ya se tenía del microorganismo y la enzima asociada.

7.3.1. Contaminación del cultivo

Con el fin de descartar una posible contaminación de las células de *L. citreum* utilizadas en la reacción, con alguna de las cepas de *E. coli* (Gram negativo) con las que se trabaja en el laboratorio, se realizaron observaciones al microscopio de las células producidas y una tinción de Gram.

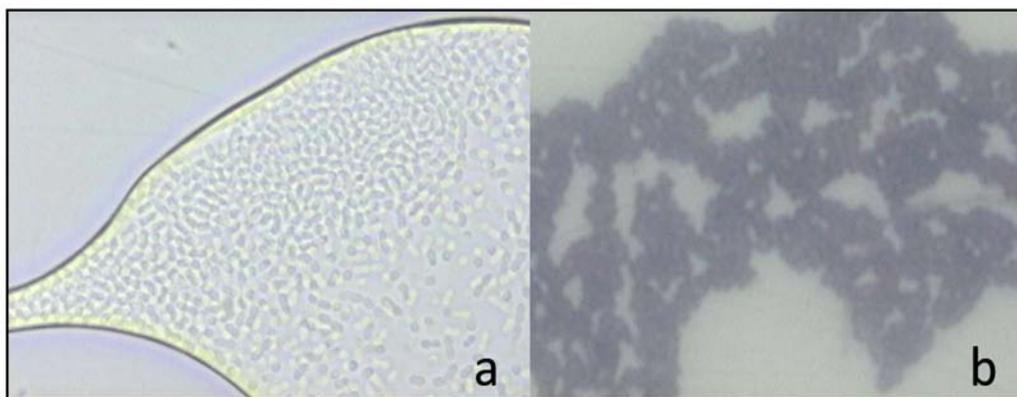


Figura 18. Fotografías de las vistas al microscopio de las células de *L. citreum* solubilizadas (a) y tratadas con la tinción de Gram (b) (100X).

En la Figura 18 se puede observar que el cultivo utilizado en la reacción, es una Gram positiva (color violeta), además las células presentan una forma ovoide característica de *Leuconostoc citreum* (Olivares-Illana y col., 2002). También es notable la homogeneidad en la población y que no existen otras estructuras en la muestra al microscopio. Por lo tanto se descartó contaminación por alguna bacteria Gram negativa, aunque para asegurar que solo se tienen bacterias de *Leuconostoc citreum* CW28 es necesario hacer estudios más profundos.

7.3.2. Pérdida de la actividad transferasa

Se consideró entonces que podría haber una pérdida de la actividad transferasa, resultado de una proteólisis parcial de la enzima por haber realizado el cultivo del microorganismo a 30°C, de acuerdo a lo reportado por Ortíz-Soto (2004), aunque tampoco se determinó la razón de la proteólisis en ese trabajo. Dado que cuando se mide la actividad con el método de DNS se obtiene la actividad global,

la enzima puede tener la misma actividad global reportada en otros trabajos (Tabla 4) pero presentar una actividad hidrolítica mucho mayor a la de transferencia, de manera que no se observe producción de inulina en la reacción.

Para descartar esta posibilidad, se analizaron muestras directamente del medio de cultivo durante la etapa de crecimiento de las células (6 y 7 horas de cultivo) de un glicerol del mismo lote que las utilizadas para obtener las células que sirvieron de biocatalizador en las reacciones de síntesis de inulina, tanto a 20 como a 30°C para determinar si existía una diferencia en la producción de inulina, y por lo tanto de la enzima, en estas condiciones.

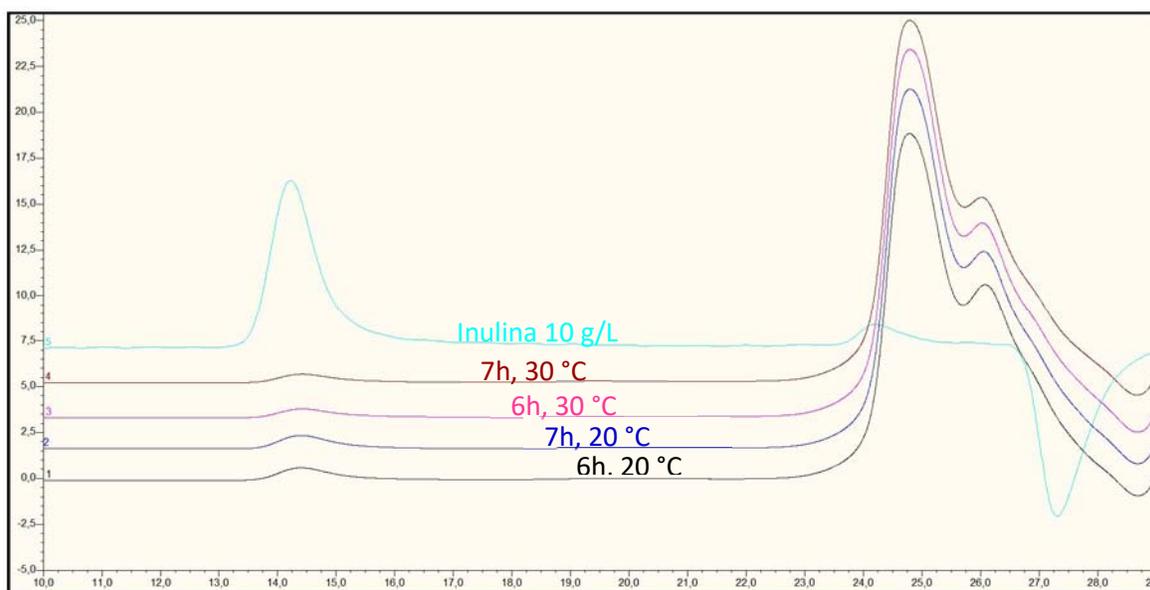


Figura 19. Cromatograma de muestras de cultivo de *L. citreum* tomadas a diferentes tiempos a dos temperaturas. En todas las muestras hay inulina, lo que demuestra la actividad de Is IA.

En la Figura 19 se muestra que durante el crecimiento de *L. citreum* a ambas temperaturas existe síntesis de inulina, de manera que el cambio de temperatura no parece afectar a la enzima. Por lo tanto, se descartó que la proteólisis de la enzima le hiciera perder la actividad transferasa.

Cabía la posibilidad de que durante la cosecha de las células o sobre todo al descongelarlas se estuviera dañando la enzima, de manera que se perdiera la actividad transferasa, por lo tanto, se realizó un zimograma (Figura 20) con el objetivo de asegurar que la enzima activa, capaz de formar polímero, estuviera aún en las células.

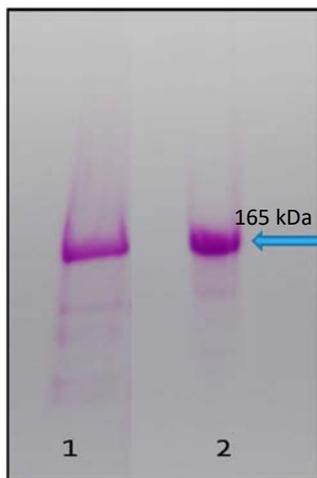


Figura 20. Zimograma de células de *L. citreum*. 1) células refrigeradas, 2) células congeladas. La IsIA está señalada con la flecha azul.

Para el zimograma, se utilizaron células completas, con una semana de almacenamiento y las células congeladas fueron descongeladas a temperatura ambiente por 30 minutos para ser colocadas en el gel. Las bandas que se observan, son polímero teñido con reactivo de Schiff. De esta manera quedó demostrado que las células refrigeradas y congeladas aún contenían a la enzima y que ésta tenía la capacidad de producir polímero, descartándose la pérdida durante la cosecha. Sin embargo, es interesante hacer notar que en ambos casos la enzima se está proteolizando, lo que puede concluirse por la aparición de bandas más tenues por debajo de la banda principal. Este fenómeno ya había sido reportado para esta enzima (Ortíz-Soto, 2004) y para otras FTFs (Argüello-Morales y col., 2005) y al parecer es debido a las proteasas que producen las células.

7.3.3. Desactivación de la enzima por pH

Hasta este punto todos los resultados mostraban que la enzima estaba activa en las células antes de utilizarlas en una reacción de síntesis, de manera que la inactivación de las células tenía que ocurrir durante la reacción. Entonces el siguiente punto a revisar fue el comportamiento del pH del medio de reacción durante las reacciones de síntesis reportadas en la primera sección de éste subcapítulo, dado que Maturano (2014) ya había observado una caída del pH en un medio mínimo con sacarosa como fuente de carbono, relacionada con la producción de ácidos orgánicos y que Olivares-Illana (1998) en la caracterización de la enzima asociada a las células determinó que ésta pierde alrededor del 60% de su actividad global cuando el pH del medio de reacción es de 4.5. Las mediciones de pH se llevaron a cabo con tiras reactivas (Merck) debido a la pequeña cantidad de muestra disponible.

Se observó que el pH durante la primera hora de reacción descendía hasta valores menores de 4.0, a pesar de que la reacción se llevó a cabo en una solución amortiguadora a pH 6.5. Este nivel de acidez alcanzado tan temprano en la reacción podría ser la causa de la inactivación de la enzima, evitando la síntesis de inulina.

Para verificar si la disminución del pH es efectivamente el factor que desactiva a la enzima, se realizó una prueba utilizando una solución amortiguadora de fosfatos de mayor concentración, de manera que el pH se mantuviera durante más tiempo cercano al valor inicial. Se colocaron reacciones a 30°C con 1 U/mL de células que se hallaban en congelación, 100 g/L de sacarosa y soluciones amortiguadoras de fosfatos a 200 mM y 50 mM con pH 6.5. Se tomaron dos muestras: 1 y 4 h de reacción, y se cuantificó la inulina (Figura 21).

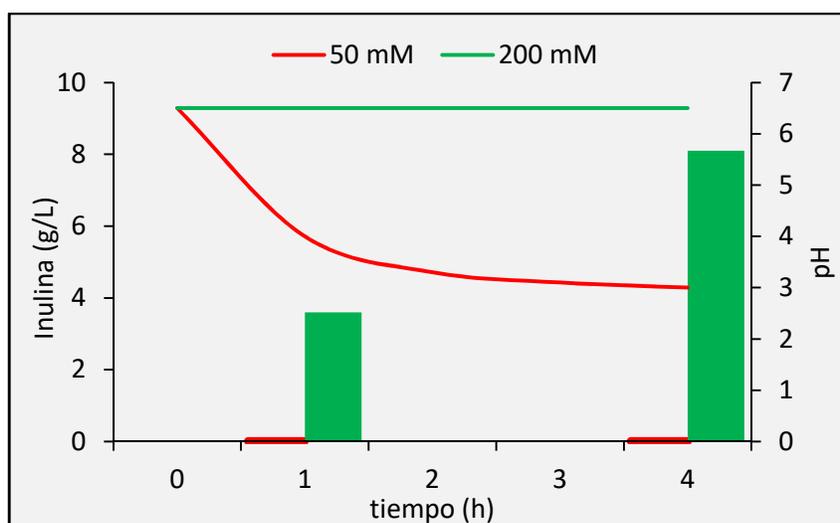


Figura 21. Producción de inulina y comportamiento del pH de la reacción con soluciones amortiguadoras de diferente capacidad. Al incrementar la capacidad de amortiguamiento de la solución de la reacción, el pH se mantiene y la enzima puede producir inulina.

Como puede observarse en la Figura 21, en las reacciones en las que el amortiguador se empleó a una concentración baja (50 mM), no hay producción de inulina como consecuencia de la disminución del pH hasta un valor menor a 4.0, de acuerdo con la medición con tiras reactivas.

En contraste, en la reacción con la solución amortiguadora de 200 mM se observó producción de inulina. Dado que el pH se mantuvo estable durante el tiempo que duró la reacción, se puede explicar el fenómeno de pérdida de actividad por los cambios asociados al pH de la reacción. Estos datos corroboran que la ausencia de inulina en la reacción de la primera sección de este apartado, se debió a la desactivación de la enzima por una disminución drástica del pH.

7.3.4. Efecto de la caída de pH durante la reacción de síntesis de inulina.

Una vez demostrado que la regulación del pH es un factor determinante en la producción de inulina, y que el uso de una solución amortiguadora con mayor capacidad amortiguadora puede controlar el descenso del mismo, se analizó el efecto de diversas concentraciones de sacarosa y dosis de enzima en la producción de inulina, buscando el mejor rendimiento posible. Se utilizó una solución amortiguadora de fosfatos 200 mM pH 6.5 que resultó ser insuficiente para mantener el pH durante el tiempo que requieren las reacciones. En la Tabla 5 se reportan las condiciones experimentales de reacción y el tiempo requerido para alcanzar más del 90% de conversión (teórica).

Tabla 5. Condiciones usadas para la producción de inulina con amortiguador de fosfatos 200 mM pH 6.5.

	1U/mL			5U/mL		
	100	250	400	100	250	400
Sacarosa inicial (g/L)	100	250	400	100	250	400
Tiempo de reacción teórico (h, % conv > 90)	7	13.5	20	1.4	2.7	4
pH final	3-4	3-4	3-4	3-4	3-4	3-4

En las muestras de una de las reacciones donde el pH descendió más lentamente (1U y 100 g/L de sacarosa) se realizaron pruebas cromatográficas para determinar la cantidad de polímero que se produjo en la reacción a través del tiempo.

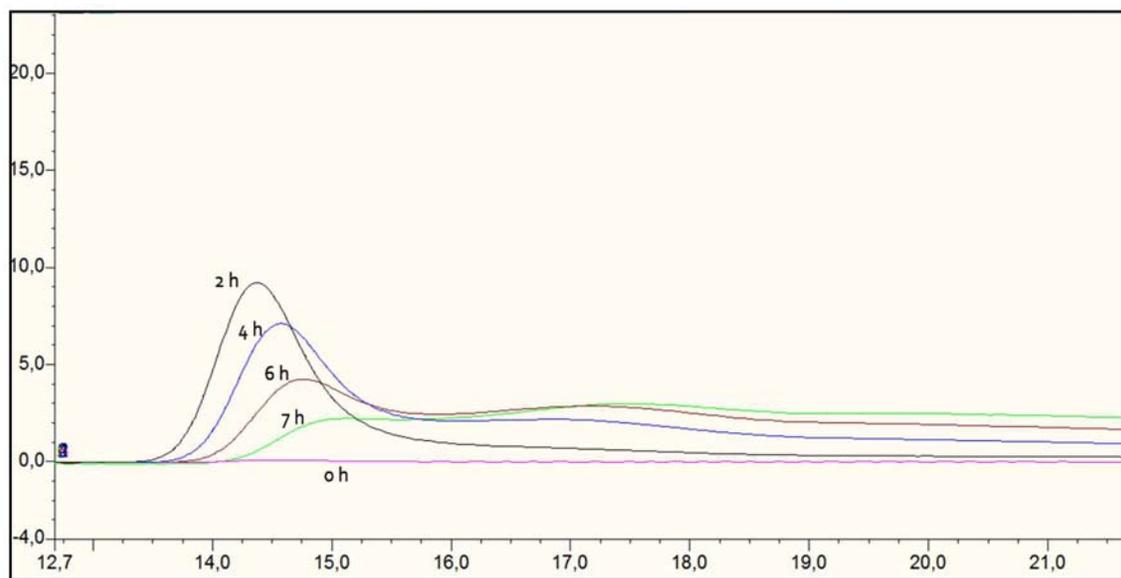


Figura 22. Cromatograma de la producción de inulina con 1 U/mL de IsIA y 100 g/L de sacarosa en amortiguador de fosfatos 200 mM pH 6.5. Al paso del tiempo de la reacción es posible observar un cambio en la señal de la inulina, que podría corresponder con una disminución en la masa molecular.

Como puede observarse en la Figura 22, el cromatograma muestra la existencia de inulina a 2 h de haber iniciado la reacción, la concentración que se alcanza es de aproximadamente 9 g/L y el pH se mantiene en 6.0. Sin embargo, al descender el pH a 4.0, el perfil de la inulina cambia, incrementándose la distribución de masas moleculares, lo que sugiere que existe una hidrólisis de la misma.

Considerando que existen reportes de hidrólisis no enzimática para la inulina de achicoria cuando se tiene un pH de 4.0 (Glibowski y col., 2011) se realizaron pruebas colocando inulina de *L. citreum* (9 g/L) en una solución con ese pH (preparada con amortiguador de fosfatos 50 mM y ácido acético) a 30°C y 1000 rpm por 7 h, condiciones como las que se tienen en la reacción. Se tomaron muestras a las que se les determinó liberación de AR, obteniendo resultados negativos. Las mismas muestras se sometieron a análisis de GPC donde no se observó diferencia en el perfil de la inulina al principio y al final de la incubación, es decir, no hay hidrólisis de la inulina bacteriana cuando el medio de reacción tiene un pH bajo.

Dado que la modificación del perfil de la inulina se observó en presencia de células de *L. citreum*, se repitió el experimento anterior en presencia de las células (1U/mL) a pH 6.5 y pH 4.0 a 30 °C por 7h. Las muestras de horas iniciales y finales fueron analizadas por cromatografía (GPC), sin encontrar diferencias en el perfil del polímero. Se realizaron ensayos para medir AR, mismos que resultaron negativos. Se realizó también una cromatografía en capa fina (TLC) mostrada en la Figura 23, donde se observa que no existe liberación de otros productos, por lo tanto no hay hidrólisis de inulina. Los puntos en la parte inferior de la placa corresponden a inulina de gran masa molecular.

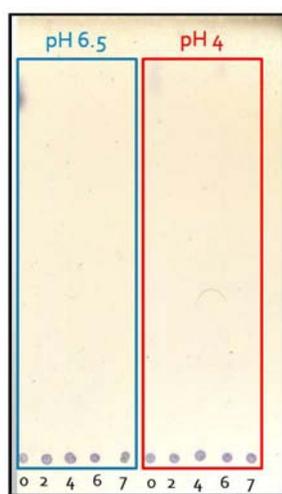


Figura 23. TLC de la reacción 1U de células, 9 g/L de inulina bacteriana a pH 6.5 y 4.0. Las manchas en la parte inferior demuestran la existencia de polímero. La ausencia de manchas en la parte media y superior de la placa indica que la muestra no contiene productos de hidrólisis de inulina.

Posteriormente se procedió a usar células que ya hubieran llevado a cabo una reacción de síntesis donde el pH hubiera descendido. Éstas se recuperaron y se colocaron con inulina (9 g/L) en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5 a 30°C por 7h a 1000 rpm. Se hicieron análisis con el fin de detectar liberación de azúcares reductores, mismos que resultaron negativos, al igual que placas de TLC, concluyéndose que no existe hidrólisis. Sin embargo, las muestras se analizaron con el cromatógrafo, donde se pudo observar el cambio en el perfil de elusión de la inulina (Figura 24).

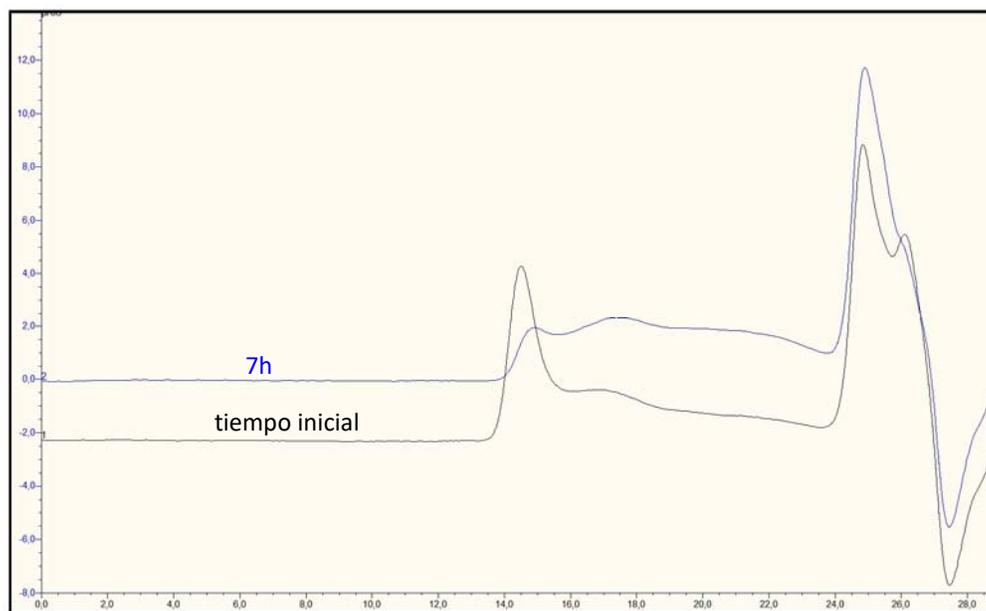


Figura 24. Perfil cromatográfico (GPC) de la inulina bacteriana en reacción con células de *L. citreum* al inicio y después de 7 horas de incubación. Se observa el cambio en la señal de la inulina, que correspondería a un cambio en su masa molecular.

Se realizó un control tratando la inulina tanto con células frescas, como con células de una reacción de síntesis donde el pH se mantuviera cercano al 6.5 inicial (con la solución amortiguadora de mayor capacidad), obteniéndose que el perfil cromatográfico para la inulina no presentaba ninguna variación entre el inicio y el final de la incubación para cada prueba.

De ésta manera, se determinó que las células que pasan por una reacción de síntesis donde el pH haya disminuido drásticamente, son capaces de provocar un cambio en el perfil del masa molecular de la inulina, que solo fue observado en GPC.

Con base en los resultados obtenidos en los experimentos que se han presentado, se realizó un zimograma cargado con inulina, utilizando células de una reacción de síntesis en la que el pH hubiera descendido hasta 3-4, con el fin de buscar una posible endoinulinasa que explicara el cambio en el perfil de la masa molecular.

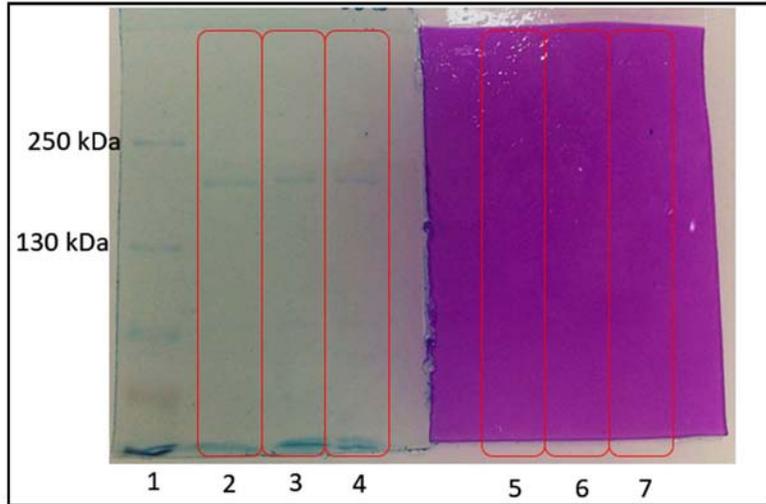


Figura 25. Zimograma cargado de inulina. Carriles 1: marcador de masa molecular. 2 y 5 células sin reacción. 3, 4, 6 y 7 células recuperadas de la reacción de síntesis con pH final 4.0. No hay halos transparentes que indiquen la existencia de una inulinasa.

En la Figura 25 puede observarse que no hay ningún halo transparente en el zimograma que indique la existencia de una enzima que actúe sobre la inulina, dando lugar a los productos de menor masa molecular que se observan en los cromatogramas por GPC. Sin embargo, es posible que el cambio en la masa molecular de la inulina que se detecta por éste método, no sea lo suficientemente drástico, y los productos aún sean susceptibles al cambio de color por parte del reactivo de Schiff (polímeros más pequeños), de modo que no se observan cambios en el zimograma.

Una opción para resolver la incógnita del cambio en el perfil de la masa molecular de la inulina, es secuenciar el genoma de la bacteria *L. citreum* y analizarlo buscando secuencias similares a las de las inulinasas que ya se conocen. Esta opción se está desarrollando. No se descarta tampoco que el cambio de perfil sea un artefacto del GPC dado que es el único método por el que se observa un cambio en la inulina.

7.3.5. Condiciones para producción de inulina.

Entonces, dado que la liofilización de las células parece inactivar el metabolismo de las células, y por lo tanto la producción de ácidos orgánicos, se decidió utilizar este procedimiento para almacenarlas para el resto del proyecto. Adicionalmente, se probaron concentraciones mayores de amortiguador de fosfatos para evitar la caída del pH durante la reacción. Sin embargo, el pH desciende en todos los casos (Tabla 6).

Tabla 6. Condiciones de síntesis de inulina con amortiguador de fosfatos 300 mM, pH 6.5 y enzima de células liofilizadas.

	1 U/mL			5 U/mL		
Sacarosa inicial (g/L)	100	250	400	100	250	400
Tiempo de reacción teórica (h, % conv > 90)	7	13.5	20	1.4	2.7	4
pH final	6	5-6	5-6	5-6	5-6	5-6
Inulina producida (g/L)	9.7±0.7	23.7±0.9	27.4±0.7	21.2±0.5	24.1±0.3	33.4±.3

En las muestras tomadas al final de cada reacción se determinó la producción de inulina, encontrando que la concentración máxima obtenida fue de poco más de 30 g/L para la reacción de 5 U/mL y 400 g/L de sacarosa inicial. Esta cifra aún está muy por debajo de la reportada por Ortíz-Soto (2004), donde se utilizó un reactor y el pH fue controlado con la adición de NaOH 1M en un reactor, aunque no se sabía que las células eran capaces de producir ácidos orgánicos en la reacción de síntesis y que éstos podían afectar la actividad enzimática de ISIA.

En este proyecto, por otro lado, se consideró que para el tamaño de las reacciones llevadas a cabo (la mayoría de 1 mL), era más fácil controlar el pH incrementando la capacidad de la solución amortiguadora (concentración). Sin embargo, esto incrementa la fuerza iónica del medio de reacción y existen reportes de que la fuerza iónica del amortiguador tiene un efecto negativo en la formación de polímeros sintetizados por otras fructosiltransferasas (Tanaka y col., 1978).

Se probó una solución amortiguadora de acetatos 300 mM pH 6.5, que mantiene el pH constante durante la reacción sin importar que haya incrementos en la concentración de sacarosa inicial o en la cantidad de células utilizadas.

A comparación de usar el amortiguador de fosfatos, con el amortiguador de acetatos, la producción máxima de inulina aumentó a 40 g/L cuando se emplearon 5 U/mL de enzima (células liofilizadas) con 250 g/L de sacarosa en 3 h de reacción, con una conversión de sacarosa del 75%. Probablemente la mejora al cambiar la solución amortiguadora tenga que ver con el cambio de ion en la solución, pero hacen falta más pruebas para determinar esta situación.

7.3.6. Estabilidad de la enzima en el proceso de producción de inulina

Hasta este punto del proyecto, todos los experimentos desarrollados han demostrado que durante la reacción de síntesis el control del pH es indispensable para obtener mejores rendimientos de

inulina. Bajo esta consideración, dado que el amortiguador de acetatos 300 mM pH 6.5 es capaz de mantener el pH constante durante la reacción de síntesis, las nuevas pruebas de estabilidad operacional se realizaron con esta solución, a 30°C y 1000 rpm, con ciclos de síntesis de 3 horas. En la Figura 26 se reporta la caída de actividad con el reúso de las células observándose que las células soportaron 5 ciclos de síntesis de inulina antes de perder aproximadamente la mitad de su actividad enzimática.

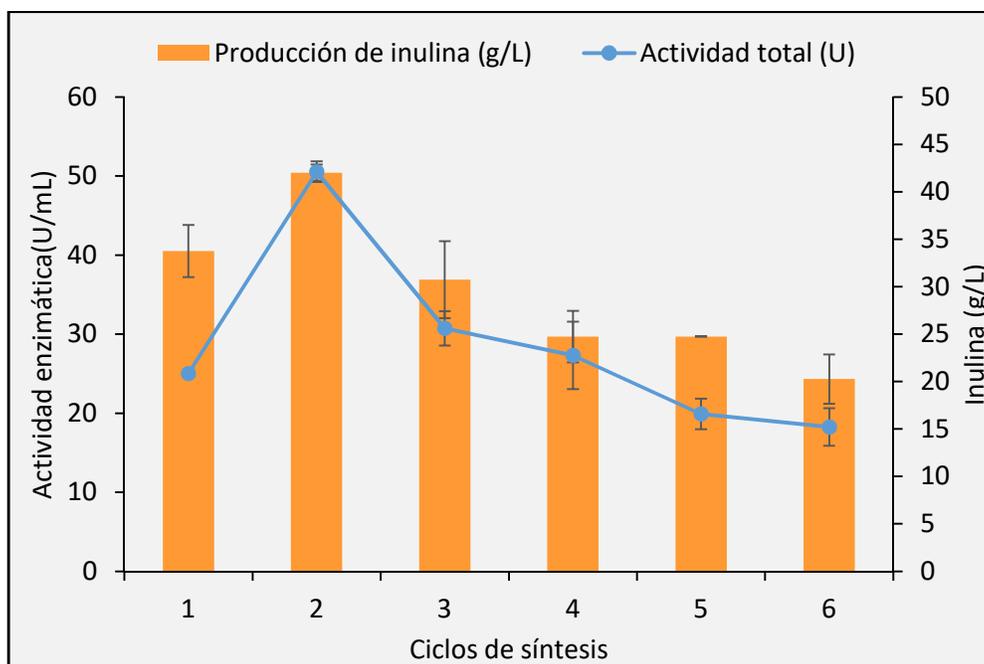


Figura 26. Determinación de la actividad operacional de la enzima *IsIA* asociada a las células de *L.citreum* y producción de inulina en ciclos de síntesis. La actividad reportada es con la que se inicia cada ciclo y la cantidad de inulina reportada es la obtenida al final de cada reacción.

El incremento en la actividad enzimática observado en este experimento después del primer ciclo de síntesis se debe probablemente a una modificación de la pared celular debido a la reacción, que incrementa la permeabilidad de la misma y por tanto la disponibilidad de la enzima, incrementando a su vez la actividad global que puede medirse. En las reacciones catalizadas por células completas a menudo es necesario permeabilizar la pared celular por medios físicos o químicos para incrementar las tasas de actividad de las enzimas de interés (de Carvalho, 2011). Siguiendo esta lógica, lo más probable es que en los ciclos subsecuentes la pared siga perdiendo integridad, de manera que la enzima ya no pueda seguir anclada a ella, perdiéndose en los lavados o desactivándose al quedar libre.

La producción de inulina que se obtuvo varió entre 25 y 35 g/L, con una caída en la síntesis conforme transcurrieron los ciclos de reacción debido a la pérdida de actividad. Con la pérdida de actividad es necesario incrementar el tiempo de la reacción de síntesis para alcanzar mayores concentraciones finales de inulina.

El hecho de que las células soporten tan solo 5 ciclos de síntesis antes de perder la mitad de su actividad, parece complicar el uso de las mismas a escala industrial. Sin embargo son necesarias más pruebas a otras escalas y optimizar el reciclado de las células para poder determinar la viabilidad económica de este biocatalizador.

7.4. Actividad de Novozym 960© sobre inulina de *L. citreum*

Se habían hecho pruebas muy básicas sobre la capacidad hidrolítica de la endoinulinasa de Novozym con la inulina bacteriana, en esta parte del proyecto se ampliaron los estudios al respecto.

7.4.1. Estabilidad de la actividad enzimática de Novozym 960©

Se determinó la actividad enzimática del lote de Novozym 960© del que se dispone en el laboratorio. Siguiendo la metodología ya descrita para la medición de la actividad a 50°C, se encontró que la preparación tenía una actividad de 1664 U/mL sobre inulina HP de Orafiti. Maturano (2013) reportó una actividad de 1518 U/mL a 50°C y en un estudio previo en el laboratorio se habían calculado 1878 U/mL a 60°C. Esto da cuenta de una buena estabilidad de la enzima almacenada, superior a la vida de anaquel que indica el proveedor en la ficha técnica del extracto (3 meses a partir de la fecha de entrega), pues la enzima tiene ya 5 años en refrigeración.

7.4.2. Capacidad hidrolítica de Novozym 960© sobre la inulina bacteriana

Se realizó una prueba preliminar con inulina bacteriana en la concentración máxima obtenida en síntesis con Isla, es decir 40 g/L en amortiguador de acetatos 300 mM pH 6.5 a 30°C, 1000 rpm por 3 h con diferentes cantidades de Novozym. Los productos de reacción en las muestras en tiempo final de reacción se analizaron en placas de TLC.

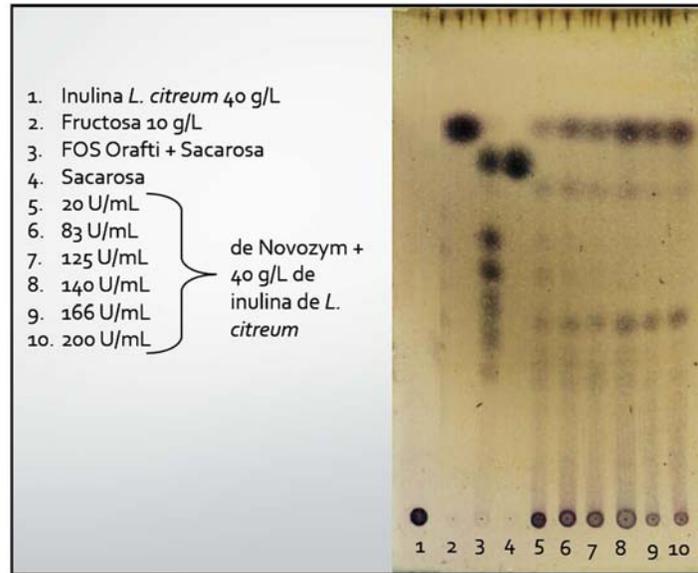


Figura 27. Productos obtenidos en reacciones de hidrólisis de inulina de *L. citreum* con diferentes cantidades de Novozym 960®, observados mediante TLC.

En la Figura 27 puede observarse que al final de todas las reacciones hay liberación de FOS de GP 3 a 7 y de fructosa, incrementándose esta última proporcionalmente a la cantidad de enzima utilizada. La inulina residual aún se observa en las muestras, aunque debe recordarse que el tiempo de reacción se limitó a 3 h.

A pesar de confirmarse la actividad endoinulinasa de la preparación mediante la aparición de FOS durante la reacción, la detección de fructosa libre detectada en la placa y el hecho de que Novozym 960 se venda como extracto enzimático y no como enzima pura, hizo dudar sobre la posible existencia de una exoinulinasa en el preparado enzimático. Los reportes para Novozym 960® solo señalan trazas de monosacáridos como resultado de la reacción sobre inulina de achicoria, es decir, una actividad típicamente endo-hidrolítica (Mutanda y col., 2008). Para probar si el preparado contenía más de una enzima se realizó un zimograma con inulina de *L. citreum* (bacteriana) (Figura 28).

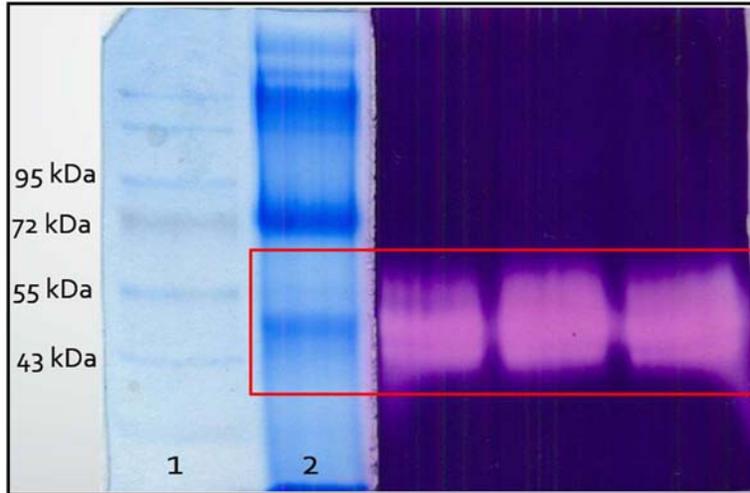


Figura 28. Zimograma del preparado de Novozym 960©. 1: marcador de masa molecular, 2: Novozym 960© teñido con Blue stain, los carriles del lado derecho (morado) son de Novozym 960© teñidos con reactivo de Schiff. Las bandas transparentes del lado derecho demuestran la actividad inulinasa contenida en la banda correspondiente.

El zimograma permitió determinar que si bien existe más de una proteína en el extracto enzimático, solo una de ellas tiene actividad sobre la inulina (halo transparente).

Por lo tanto, la liberación de fructosa en las reacciones preliminares, podría deberse a la existencia de una exoinulinasa en el extracto que tenga una masa molecular muy cercano al de la endoinulinasa o a un exceso en la dosis de enzima, en relación con la concentración inicial de inulina. Se realizó otra placa de TLC para observar el comportamiento de la reacción con una menor cantidad de enzima (20 U/mL de endoinulinasa) en tiempos cortos.

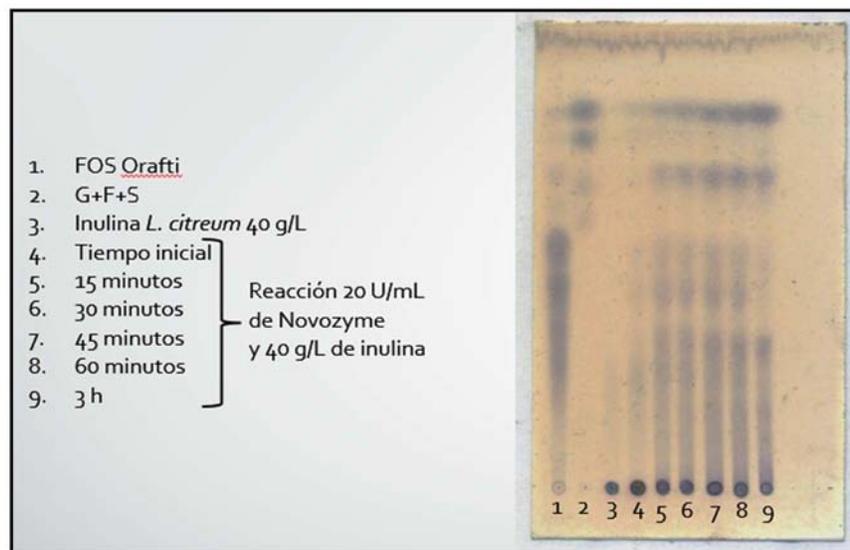


Figura 29. Evolución de los productos obtenidos en reacciones con Novozym 960© sobre inulina de *L. citreum* (40 g/L) a través del tiempo, observados mediante TLC.

En la placa de la Figura 29 la liberación de FOS y fructosa después de 30 minutos de reacción es visible, productos que se incrementaron con el avance de la misma. Los resultados obtenidos en estas reacciones, permiten plantear la posibilidad de conseguir reacciones donde se liberen la menor cantidad de fructosa a partir de la regulación de la dosis del extracto y el tiempo de reacción.

Se realizó una prueba de la actividad de la enzima sobre inulina HP de Orafti, para determinar si la liberación de fructosa puede ser función de la estructura de la inulina, en este caso a la estructura ramificada de la inulina de *L. citreum*.

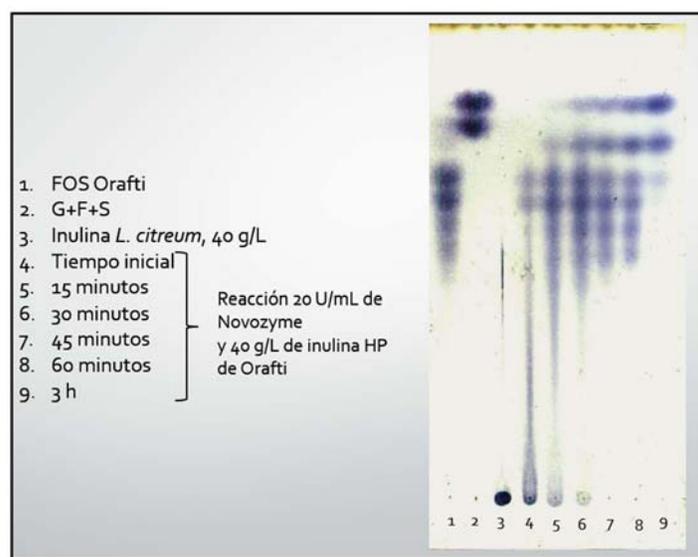


Figura 30 Evolución de los productos obtenidos en reacciones con Novozym 960© sobre inulina de achicoria (HP, 40 g/L) a través del tiempo, observados mediante TLC.

En la reacción que se muestra en la Figura 30 también hay liberación de fructosa, y ésta va incrementándose con el paso del tiempo, igual que en la reacción con inulina de *L. citreum*. Éste resultado confirma la presencia de actividad exoinulinasa en la muestra y respalda la conclusión de que es posible controlar la producción de FOS y la liberación de fructosa modificando los tiempos de reacción.

7.4.3. Constantes cinéticas de Novozym sobre inulina bacteriana

Se calcularon los parámetros cinéticos de la endoinulinasa de Novozym 960 en la solución amortiguadora de acetatos 300 mM pH 6.5 a 30°C con la inulina de *L. citreum* como parte de la caracterización de la enzima en la hidrólisis de este sustrato. Dado que la inulina que se utilizó no

tiene una masa molecular exacta, sino que existe en un rango de 2600 a 3400 kDa (Ortíz-Soto, 2004), la concentración está expresada en equivalentes de fructosa.

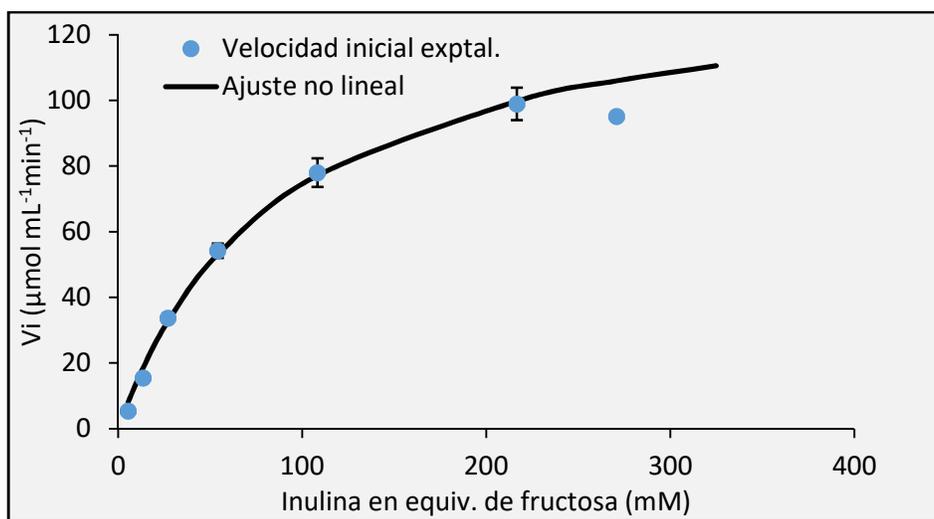


Figura 31. Comportamiento cinético de Novozym 960 sobre inulina de *L. citreum* a 30°C. Se utilizó un rango de concentraciones de inulina desde 1 hasta 60 g/L y 25 U/mL de reacción de Novozym 960.

El comportamiento de la endoinulinasa sobre la inulina bacteriana en las condiciones planteadas es de tipo Michaelis-Menten. A partir de estos datos se obtuvieron los valores de las constantes $K_m = 89.9$ mM y $V_{max} = 141.1$ $\mu\text{mol mL}^{-1}\text{min}^{-1}$ para la inulina de *L. citreum*. Es importante señalar que para la inulina de achicoria se reportó un valor de K_m de 3.3 mM con una actividad de $V_{max} = 666.6$ $\mu\text{mol mL}^{-1}\text{min}^{-1}$, aunque a 60°C, estos datos están referidos a la enzima purificada a partir del extracto comercial (Mutanda y col., 2008). A partir de la comparación de las constantes K_m podría afirmarse que la enzima tiene más afinidad sobre la inulina de achicoria, probablemente porque es mucho más pequeña (GP 60) que la inulina bacteriana (GP > 7000), también tiene una actividad específica (V_{max}) más alta para la inulina vegetal que la que se obtiene con inulina de *L. citreum* como consecuencia también de la diferencia en la masa molecular. Además, a las mismas concentraciones de sustrato, la inulina bacteriana confiere una mayor viscosidad a la solución, lo que podría ocasionar problemas de difusión del sustrato en el medio de reacción. Sin embargo esta comparación no es válida ya que se está evaluando la actividad sobre inulina bacteriana a la mitad de la temperatura óptima con el fin de adecuarla a la reacción de síntesis. Una comparación adecuada debería realizarse en las mismas condiciones de reacción.

7.4.4. Efecto de la temperatura sobre la actividad de Novozym en inulina bacteriana

Para hacer comparaciones válidas entre las reacciones con diferentes sustratos, primero se realizaron pruebas para determinar el efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción de la endoinulinasa tanto con inulina de achicoria como la de *L. citreum*.

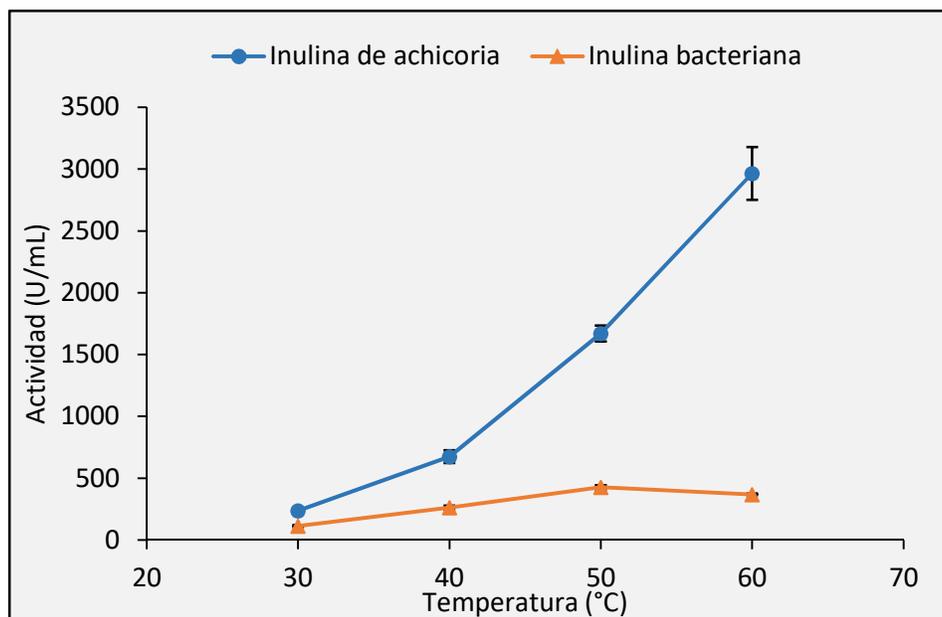


Figura 32. Efecto de la temperatura sobre Novozym 960 con inulina bacteriana y de achicoria. Al incrementar la temperatura de la reacción, existe un mayor efecto en la actividad de la enzima sobre la inulina de achicoria que sobre la bacteriana (*L. citreum*).

Se puede apreciar el efecto de la temperatura en la velocidad de reacción para la inulina de achicoria y la bacteriana. Como puede observarse claramente, a la misma temperatura la velocidad de reacción siempre es mayor con inulina vegetal que con inulina bacteriana, confirmándose así la mayor afinidad de la enzima por la inulina de baja masa molecular. Se observa que al incrementar la temperatura de la reacción, la velocidad aumenta para ambos sustratos, aunque con una influencia mucho mayor para la inulina vegetal, consecuencia de una mayor energía de activación. En el caso de la inulina bacteriana, la actividad de la enzima a 60°C tiene un pequeño descenso en comparación a la actividad a 50°C. Este fenómeno aun no ha podido ser explicado.

7.4.5. Productos de la reacción de hidrólisis

Se analizó la cinética de la hidrólisis de la enzima Novozym 960 sobre inulina bacteriana, la producción de FOS y la liberación de otros productos en la reacción. Estos experimentos se definieron con base en pruebas preliminares en las que se encontró que una dosis de 50 U/mL de reacción fue suficiente para hidrolizar 40 g/L de inulina en tres horas de reacción a 30°C.

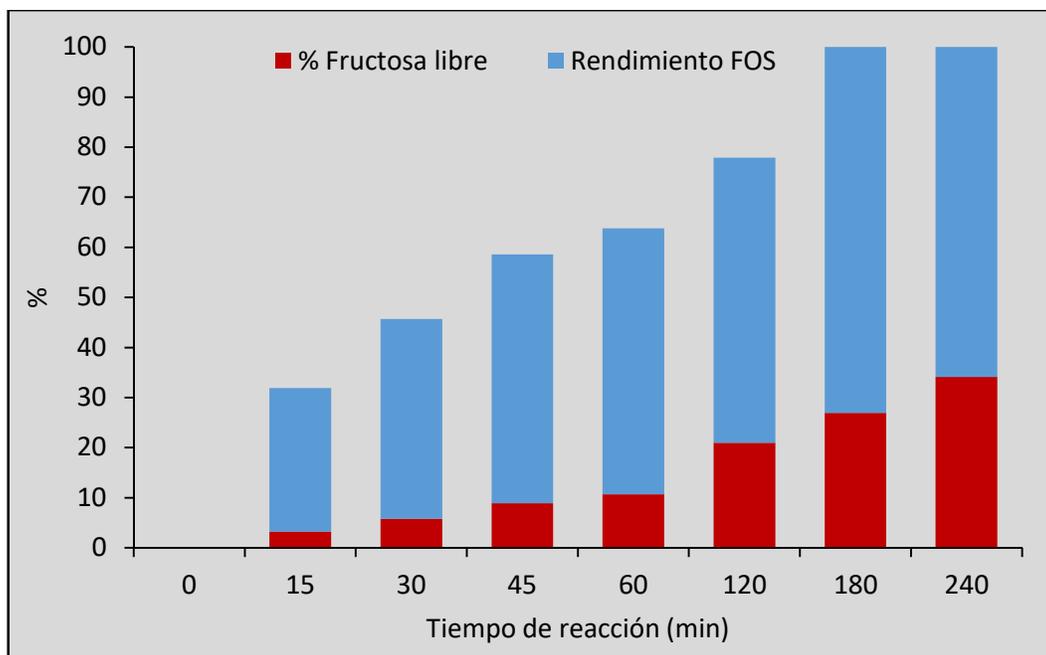


Figura 33. Evolución de la reacción de hidrólisis de la inulina bacteriana con la endoinulinasa Novozym 960, mediante la cuantificación de FOS y la liberación de fructosa. Condiciones de reacción: 50 U/mL con 40 g/L de inulina a 30°C, pH 6.5

Debido a que la inulina de *L. citreum* está casi completamente conformada por fructosa, sus productos de hidrólisis son únicamente fructosa libre y FOS. La concentración final de fructosa correspondió a 25% de los productos de la reacción (unos 10 g/L) y el resto son FOS que equivalen a un rendimiento de 75% con respecto a la inulina. En general los rendimientos de producción de FOS con inulinasas a partir de inulina de achicoria van del 60 al 90% y se obtienen mezclados con fructosa, glucosa y sacarosa (Singh y col., 2016). El rendimiento obtenido en ésta reacción es común, pero lo más interesante es que solo se obtiene fructosa como subproducto, debido a la composición de la inulina bacteriana. Las muestras de esta reacción se analizaron mediante HPAEC-PAD para determinar el tipo de FOS liberados en la reacción de hidrólisis.

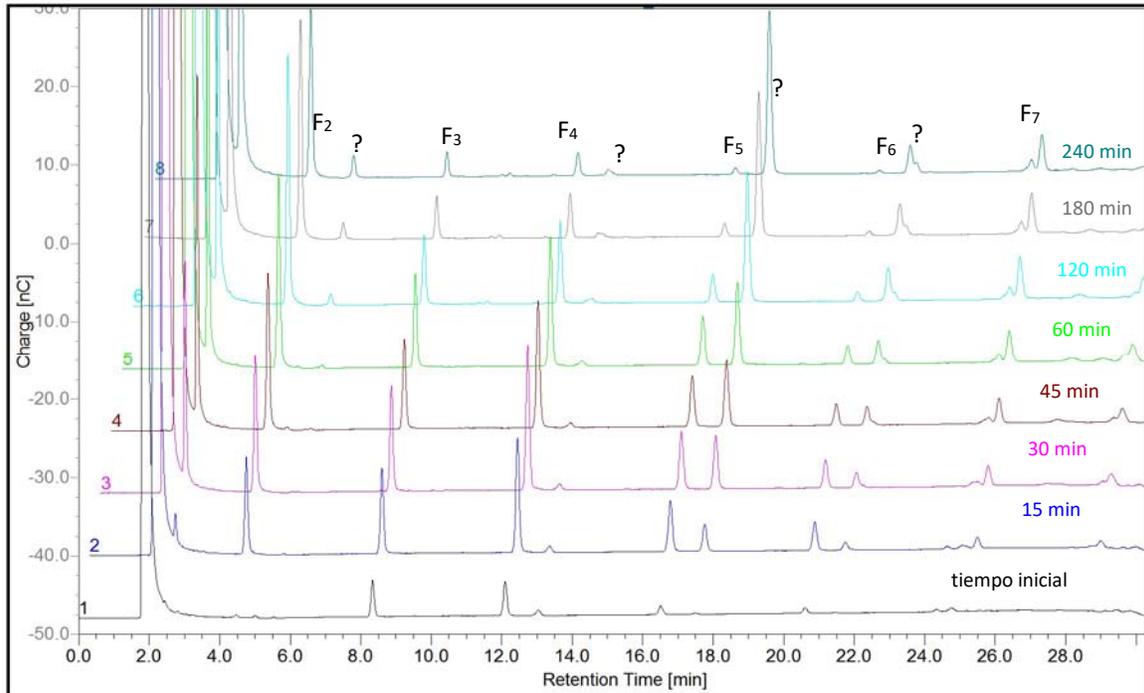


Figura 34. Cromatogramas de HPAEC-PAD que muestran la evolución de los productos de hidrólisis de inulina de *L.citreum* mediante la endoinulinasa Novozym 960.

En la Figura 34 pueden observarse los productos principales de la reacción, que son FOS de inulina de tipo F_n con GP de 2 a 7 unidades. Este perfil difiere de los que se producen comercialmente, como la Raftilosa P95 cuyo perfil se observa en la Figura 12 y que tiene una mezcla de FOS tipo GF_n y FOS tipo F_n , (con y sin glucosa en el extremo de la cadena), lo que resulta de la diferencia en la estructura de las inulinas, siendo la de achicoria más pequeña y con más residuos glucosídicos que la inulina bacteriana. En el caso de los productos señalados con un signo de interrogación (?), son compuestos que no han sido identificados todavía, pero que podrían corresponder a FOS con enlace $\beta(2-6)$ y una estructura química que fuera resultado de las ramificaciones propias de la inulina bacteriana.

7.4.6. Actividad de Novozym 960 sobre sacarosa

Los reportes que existen sobre el uso de Novozym 960 concuerdan con que la enzima no tiene actividad hidrolítica sobre sacarosa (Mutanda y col., 2008 y 2015; Karunanithy y col., 2011). Sin embargo, hay algunos reportes del uso de inulinasas (Santos y col., 2007, Risso y col., 2012) que hidrolizan la sacarosa e incluso son capaces de producir FOS de tipo GF_n a partir de ese sustrato. Por estas razones, se decidió comprobar la capacidad de Novozym 960 a 50 U/mL sobre sacarosa a 250 g/L en amortiguador de acetatos 300 mM pH 6.5, 30°C y 1000 rpm, condiciones en las que

trabajaría en conjunto con la Isla de *L. citreum*. Se tomaron muestras durante 3 horas y se analizaron con el método de DNS.

Las muestras obtenidas presentaron intensa coloración, derivada seguramente de una muy alta concentración de AR, de modo que se hizo necesario diluirlas para cuantificar con el espectrofotómetro. Este resultado implicaba por lo menos la capacidad de hidrólisis de la sacarosa por la endoinulinasa. Las muestras fueron sometidas luego a análisis en el HPLC con la columna Prevail-carbohydrate, con lo que pudo calcularse que el 84% de la sacarosa se utilizaba en los primeros 15 minutos de la reacción y la conversión llegaba a 93% después de cuatro horas de reacción. Sorprendentemente al analizar las muestras, la concentración de fructosa liberada no correspondía con la concentración de glucosa liberada, que deberían estar en proporción 1:1 en caso de existir solo hidrólisis de la sacarosa.

Revisando los cromatogramas de HPLC de la reacción, se observó la aparición de varios compuestos, de los que al menos uno pudo identificarse como 1-kestosa. Por esta razón, las muestras se analizaron también mediante HPAEC-PAD. Los cromatogramas correspondientes a éste análisis aparecen en la Figura 35.

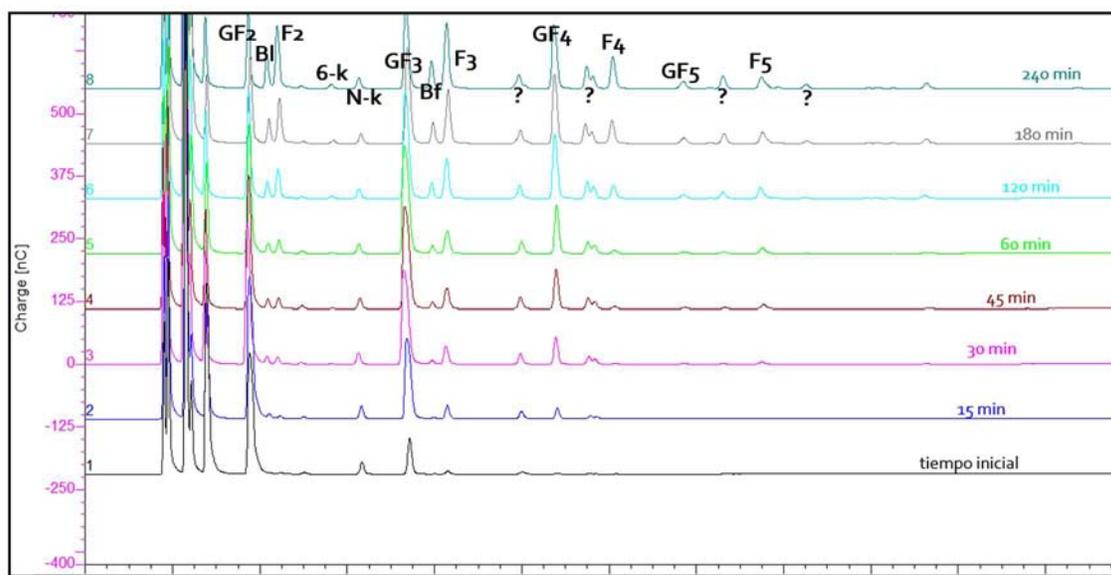


Figura 35. Cromatogramas de HPAEC-PAD que muestran la evolución de los productos de síntesis a partir de 250 g/L de sacarosa empleando 50U/mL de la endoinulinasa Novozym 960. Además de FOS F_n y GF_n , se identificaron: blastosa (Bl), 6-kestosa (6-k), neo-kestosa(N-k) y bifurcosa (Bf).

En este cromatograma se aprecian una gran cantidad de señales en cada muestra, cada una correspondiente a un sacárido diferente, en el caso del tiempo inicial, los sacáridos que se observan son resultado de la actividad de la enzima en los momentos iniciales de la reacción. Para

identificarlos se utilizaron todos los estándares de FOS con los que se cuenta en el laboratorio: tipo inulina con configuración GF_n y con configuración F_n y FOS tipo levana. Se identificaron principalmente FOS de inulina tipo GF_n y en menor cantidad de tipo F_n, también algunos pocos de tipo levana y estructuras más complejas (Bf-bifurcosa). Se observan también algunos compuestos que no han podido ser identificados aún, pero que probablemente sean FOS pequeños (GP 5-8) que pertenecen a otras series, es decir, que tienen estructuras ligeramente diferentes a las que ya se tienen plenamente identificadas, puesto que la enzima podría tener capacidad de transfructosilar sobre sacarosa o sobre alguno de los demás productos. Esto ha sido demostrado para otras enzimas FTFs (Raga-Carbajal, 2013; Siebel, 2006).

Se analizaron las fracciones de fructosa libre (hidrólisis) y transferencia (fructosa que forma parte de los FOS) de la endoinulinasa Novozym 960 en estas condiciones, encontrándose que tiene altos niveles de transferencia (82% del sustrato convertido), lo que da lugar a rendimientos en FOS mayores al 60% a partir de sacarosa.

Para comprobar si la capacidad del extracto enzimático Novozym 960 para producir FOS a partir de sacarosa era consecuencia de llevar a cabo la reacción con sacarosa a 30 °C, que es diferente a la óptima reportada para esta enzima. Para lograrlo, se llevaron a cabo reacciones a 60 °C con 250 g/L de sacarosa y 50 U/mL de la endoinulinasa. Se observó un incremento en la concentración de fructosa libre al final de la reacción (15±3 g/L), lo que implica que la actividad hidrolítica sobre sacarosa se favorece a 60 °C. También hubo una modificación en el perfil de productos (Figura 36).

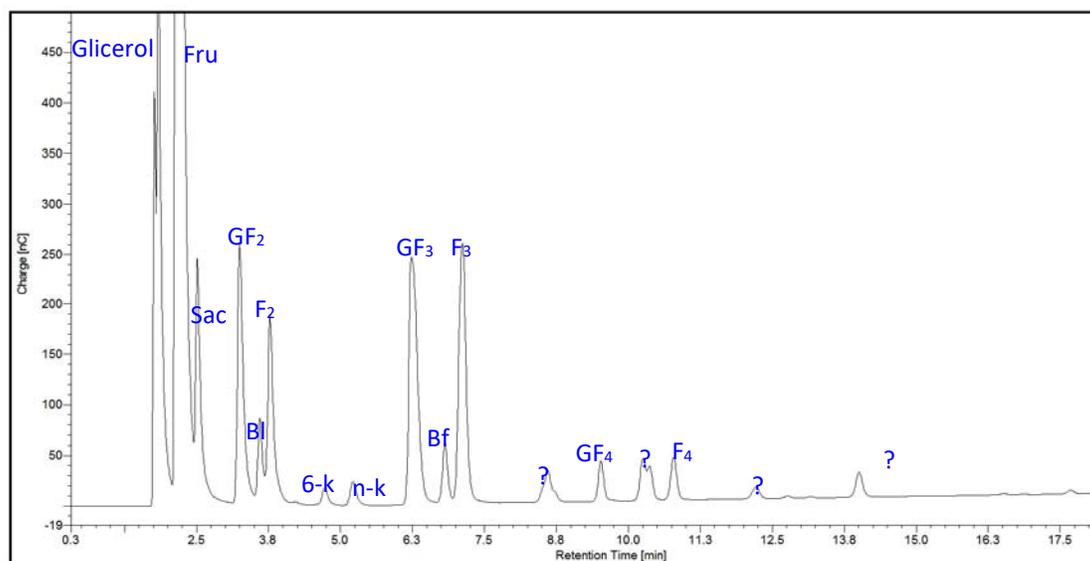


Figura 36. Perfil de productos de la reacción de 4h con 50 U/mL de Novozym 960 y 250 g/L de sacarosa a 60 °C.

Dado que el extracto de Novozym 960 contiene al menos tres proteínas, se procedió a identificar cuál de ellas era la responsable de la síntesis de FOS a partir de sacarosa. Para conseguirlo se preparó un gel SDS-PAGE con varios carriles con el extracto enzimático. La mitad del gel se tiñó con azul de Coomassie para identificar las proteínas por su masa molecular. A la otra mitad se le trató con Tween 80 al 1% en amortiguador de acetatos 300 mM pH 6.5 con el fin de renaturalizar las proteínas presentes. El gel con las proteínas renaturalizadas fue dividido en dos partes, separando la endoinulinasa ya identificada en el zimograma de la Figura 25, de las otras dos proteínas desconocidas, de modo que se obtuvieron dos fracciones de gel, que luego se hicieron reaccionar con sacarosa 250 g/L en la solución amortiguadora de acetatos durante 14 horas a 30°C. Muestras de las dos reacciones (banda con endoinulinasa y banda de proteínas desconocidas) se analizaron mediante TLC (Figura 32).

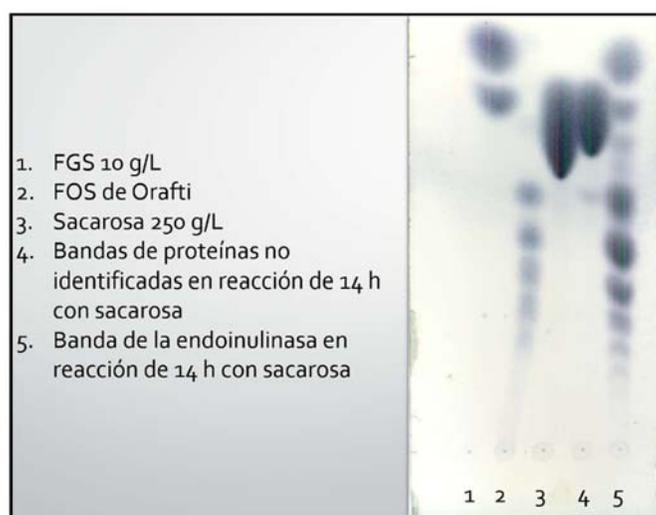


Figura 37. TLC de los productos obtenidos mediante una reacción de 14 h y 30°C, con sacarosa como sustrato y las bandas preparadas del gel de proteínas presentes en el producto Novozym 960. Las manchas en el carril 5 son FOS sintetizados por una enzima contenida en la banda que contiene la endoinulinasa.

Se observa que en los carriles de TLC obtenidos de las fracciones de gel pueden apreciarse FOS únicamente en la reacción que contiene la banda de la endoinulinasa, de modo que se podría afirmar que la enzima es responsable de la síntesis de FOS a partir de sacarosa, o al menos que la enzima responsable tiene la misma masa molecular.

La capacidad del extracto enzimático Novozym 960 para producir FOS a partir de sacarosa generó dudas con respecto a la hipótesis central de este trabajo, es decir, la factibilidad de que Novozym 960 pueda utilizarse en una reacción simultánea con la IsIA, ya que existe una probabilidad de que ambas enzimas compitan por la sacarosa.

7.5. Reacciones bi-enzimáticas: IsIA y Novozym 960.

Se llevaron a cabo los experimentos planeados en la justificación del proyecto, empleando ambas enzimas simultáneamente con el objetivo de observar si esta reacción daba lugar a un perfil de productos diferente al que produce Novozym 960 directamente sobre sacarosa. La estrategia inicial que se planteó para lograrlo, fue el de utilizar una cantidad de unidades enzimáticas de IsIA mayor que de la endoinulinasa Novozym 960, con la finalidad de que, al estar en mayor concentración, pudiera actuar primero sobre la sacarosa y producir inulina para que fuera hidrolizada inmediatamente.

Para definir esta estrategia con mayor detalle, se determinó la actividad de ambas enzimas en sacarosa a 250 g/L con el amortiguador de acetatos 300 mM pH 6.5, dado que la especificidad y actividad de las FTFs responden a cambios en la concentración de sustrato. Con base en las nuevas determinaciones de velocidad de reacción, se llevaron a cabo reacciones con diversas concentraciones de Novozym, equivalentes a 1, 2 3 y 4 U/mL, empleando una concentración constante de células equivalente a 5 U/mL de IsIA. Las reacciones se llevaron a cabo con 250 g/L de sacarosa durante 4 horas a 30°C y 1000 rpm. Se tomaron muestras para analizar el perfil de productos de cada reacción. Sin embargo, como puede verse en la Figura 38, los perfiles con concentraciones bajas (1 a 4 U/mL) de la endoinulinasa no presentan muchos productos, por lo que se decidió realizar más reacciones con concentraciones mayores de la endoinulinasa: 5, 8 y 10 U/mL de ésta por 5 U/mL de la IsIA. Como puede observarse en la misma Figura 38, las reacciones con concentraciones mayores de la endoinulinasa presentan mayor cantidad de productos.

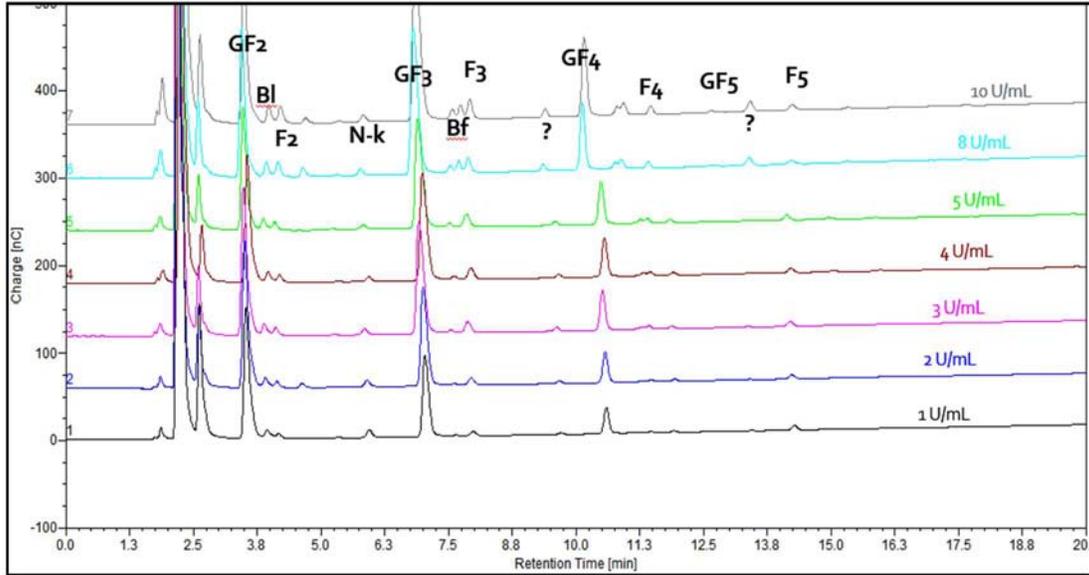


Figura 38. Cromatogramas HPAEC-PAD de los productos de reacciones bi-enzimáticas con diferentes concentraciones de Novozym 960 (1, 2, 3, 5, 8 y 10 U/mL) y una concentración de 5 U/mL de IsIA. Las reacciones se llevaron a cabo con 250 g/L de sacarosa durante 4 horas a 30°C.

De los resultados mostrados en los cromatogramas de la Figura 38, se decidió comparar con más detalle los productos de la reacción con 5 U/mL de IsIA y 10 U/mL de Novozym 960, con los obtenidos de la reacción directa con sacarosa para definir si había realmente algún cambio en el perfil de productos.

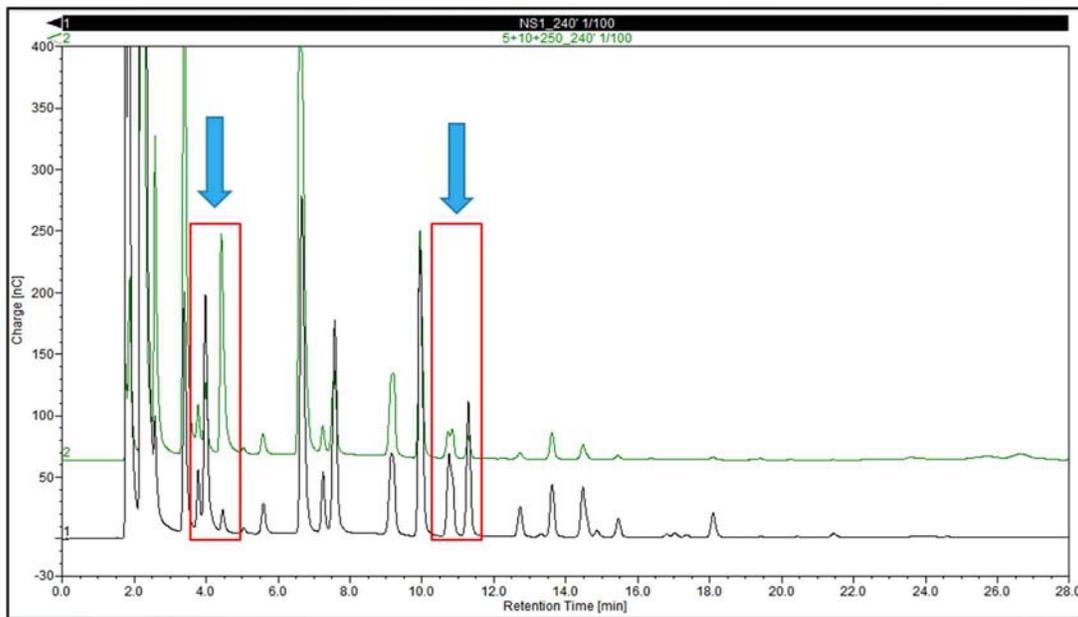


Figura 39. Comparación del perfil de productos obtenidos en la reacción bi-enzimática de IsIA-Novozym 960 (línea verde) y la reacción directa de Novozym 960 sobre sacarosa (línea negra). Los productos (señales) de cada cromatograma se corresponden, de modo que son el mismo producto.

En la comparación del perfil de productos de las reacciones (Figura 39), puede apreciarse que solo hay variaciones con respecto a las proporciones de compuestos en cada reacción, pero no en términos del tipo de productos obtenido. En el caso de la reacción bi-enzimática hay una proporción mayor de FOS de tipo GF_n/F_n, mientras que la proporción es menor en la reacción de Novozym con sacarosa. Esto se debe probablemente a que la reacción de síntesis con IsIA y sacarosa también genera FOS de tipo GF_n, que se suman a los que puede generar Novozym. Es interesante que haya FOS tipo F_n en la reacción directa, lo que indicaría que la enzima puede hacer transferencias sobre fructosa.

Era posible que la afinidad de Novozym 960 predominara en términos de especificidad sobre IsIA, por lo que para demostrar que ésta última es funcional en la reacción, y que el perfil obtenido en las reacciones bi-enzimáticas es realmente resultado de la acción simultánea de las dos enzimas es indispensable demostrar que la inulosacarasa produce inulina en algún momento de la reacción. En la Figura 40 se muestra una placa TLC resultado de la búsqueda de inulina en las reacciones bi-enzimáticas, analizando muestras a diversos tiempos de la reacción.

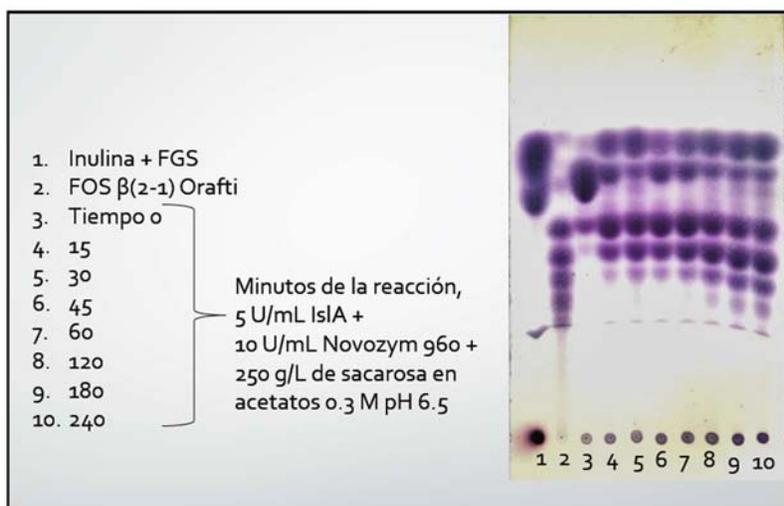


Figura 40. Evolución de los productos de la reacción bi-enzimática analizados por TLC. Las condiciones de reacción se señalan dentro de la figura.

La parte inferior de la placa muestra productos que corresponden a la inulina, comprobando que la inulosacarasa tiene actividad sobre la sacarosa de la reacción inicial y acumula inulina, que es hidrolizada por Novozym 960. Por otro lado, en la placa de la Figura 41 pueden verse los productos de una reacción de Novozym 960 con sacarosa y no se observa la formación de inulina.

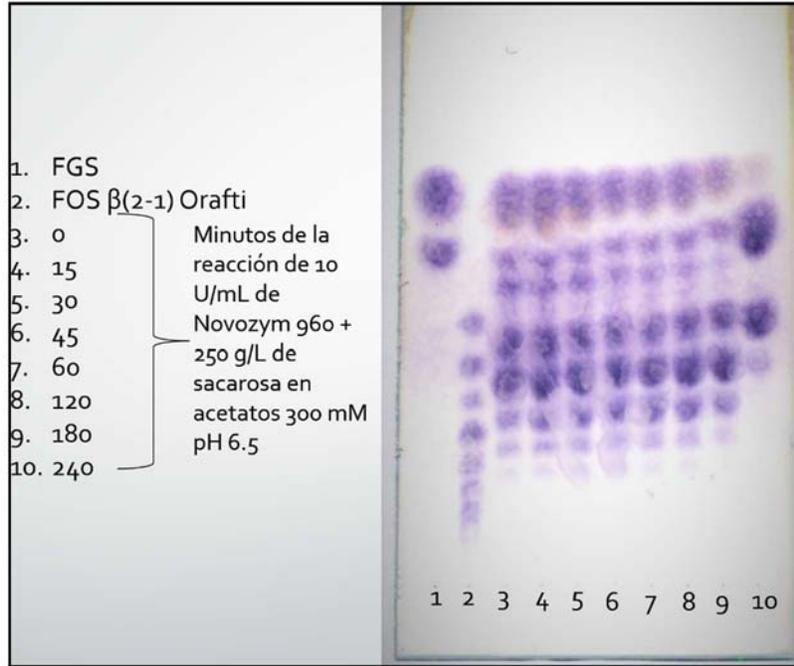


Figura 41. Evolución de los productos de reacción de Novozym 960 con sacarosa. No hay formación de inulina.

Además de la placa TLC las muestras de la reacción se analizaron por GPC para determinar exactamente cuanta inulina se produce y en la columna Prevail.carbohydrate para determinar si hay variación en la conversión de sacarosa y en las relaciones hidrólisis/transferencia de ambas reacciones, de manera que pueda probarse que la reacción bi-enzimática es diferente a la reacción directa de Novozym 960 sobre sacarosa.

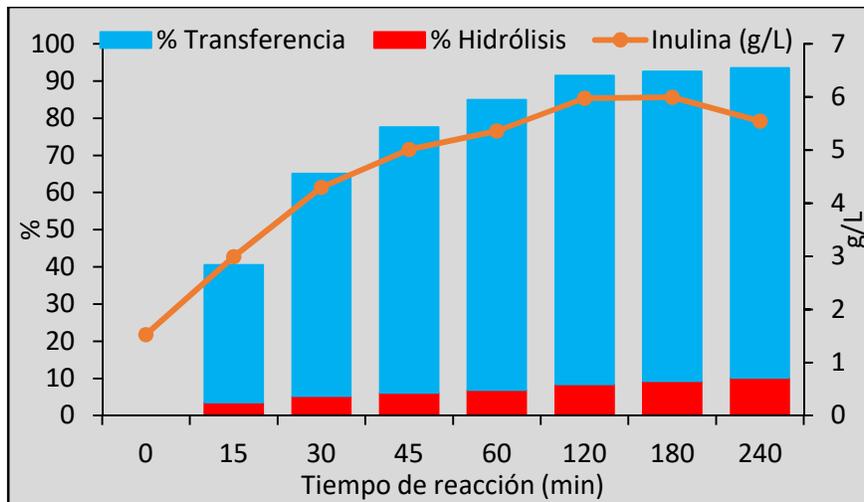


Figura 42. Evolución de la relaciones transferencia/hidrólisis y producción de inulina en la reacción bi-enzimática 5 U/mL de Isla y 10 U/mL de Novozym con 250 g/L de sacarosa.

La conversión en la reacción bi-enzimática llegó a 93%, mientras que el porcentaje de transferencia fue de 83% (Figura 43). Ambos valores son muy similares a los calculados para la reacción con Novozym y sacarosa. La producción máxima de inulina fue de 6 g/L y empezó a decrecer a partir de la tercera hora de reacción, de modo que sí hay actividad por parte de la ISIA y la endoinulinasa comienza a utilizar la inulina como sustrato.

Estos resultados indican que ambas enzimas pueden trabajar simultáneamente con sacarosa como sustrato. El perfil de productos que se presenta en la reacción simultánea es diferente a los obtenidos en la síntesis e hidrólisis individuales de la inulina y al perfil de los FOS comerciales (Raftilosa P 95) desarrollados hasta la fecha.

Sin embargo, todas las evidencias indican que la variedad de FOS que se obtienen en la reacción bi-enzimática son productos de la actividad transferasa de alguna de las enzimas de Novozym 960 sobre la sacarosa.

8. CONCLUSIONES

Se encontró que la liofilización es el mejor método de almacenamiento de la IsLA contenida en las células de *L. citreum*. Las células pueden soportar al menos 5 ciclos de síntesis de inulina. Se observó que el control de pH es determinante para que la enzima IsLA pueda producir inulina.

La endoinulinasa de Novozym 960© tiene actividad hidrolítica sobre la inulina de *L. citreum* a temperaturas compatibles con la síntesis con IsLA. El preparado comercial contiene varias proteínas, pero solo una de ellas tiene actividad hidrolítica sobre la inulina bacteriana. En el perfil de FOS obtenido de la hidrólisis de inulina con la endoinulinasa Novozym 960©, se identificaron principalmente compuestos de tipo F_n con GP de 2 a 7 unidades. Desde el punto de vista cinético, se encontró que la endoinulinasa de Novozym 960© tiene un comportamiento tipo Michaelis-Menten cuando actúa sobre la inulina bacteriana.

La Inulosacarasa de *L. citreum* y la endoinulinasa que contiene el extracto enzimático de Novozym 960, pueden trabajar simultáneamente a 30 °C con sacarosa como sustrato. El perfil de productos que se obtiene de esta reacción contiene una mezcla de FOS tipo inulina y tipo levana con estructuras GF_n y F_n ($n=2-5$) además de inulina de alta masa molecular. Este perfil es diferente y más diverso que el obtenido de la síntesis e hidrólisis secuenciales de la inulina.

Se demostró que el extracto enzimático Novozym 960 contiene al menos una enzima capaz de sintetizar FOS de muy variada composición a partir de sacarosa en una reacción a 30°C y que esta enzima tiene el mismo peso molecular que la endoinulinasa. Además, también es la responsable de la diversidad de productos de la reacción bi-enzimática.

9. PERSPECTIVAS

Dados los resultados que se obtuvieron de la hidrólisis de sacarosa con Novozym 960 y la escasa información que existe al respecto, es importante profundizar el estudio de la reacción y de la endoinulinasa misma, para conocer su mecanismo de acción.

Debe seguirse estudiando la reacción bi-enzimática, ya que es probable que si se lleva hasta el final, es decir que se agote la inulina producida por IsIA mediante su hidrólisis, el perfil de los FOS producidos cambie con respecto a la síntesis directa con Novozym 960. Incluso es interesante incrementar la concentración inicial de sacarosa para probar si el comportamiento de la reacción y el perfil es diferente.

Paralelamente al desarrollo de este proyecto, se secuenció el genoma de *Leuconostoc citreum* CW28. Es necesario revisarlo con detenimiento para determinar si existe alguna endoinulinasa que ayude a comprender lo que pasa con la inulina en las reacciones donde el pH desciende.

10. BIBLIOGRAFÍA

Abed, S. M., Ali, A. H., & Noman, A. (2016). Inulin as Prebiotics and its Applications in Food Industry and Human Health; A Review. *International Journal of Agriculture Innovations and Research* Volume 5, Issue 1, ISSN (Online) 2319-1473

Argüello-Morales, M., Sánchez-González, M., Canedo, M., Quirasco, M., Farrés, A., & López-Munguía, A. (2005). Proteolytic modification of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextransucrase. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87(2), 131-141.

Ávila F., Á. (2009). Aislamiento y expresión del ADNc que codifica para la Sacarosa: Sacarosa 1-Fructosiltransferasa de Agave tequilana Weber var. azul y caracterización de la enzima recombinante. México: Tesis de Doctorado. IBt. UNAM.

Barclay, T. G.-M. (2010). *Inulin: a versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses*. Doctoral dissertation: Internacional Excipients Concil.

Basso, A., Spizzo, P., Ferrario, V., Knapic, L., Savko, N., Braiuca & Gardossi, L. (2010). Endo-and exo-inulinases: Enzyme-substrate interaction and rational immobilization. *Biotechnology progress*, 26(2), 397-405.

de Carvalho, C. C. (2011). Enzymatic and whole cell catalysis: finding new strategies for old processes. *Biotechnology advances*, 29(1), 75-83.

Del Moral-Ventura, S. T. (2008). Función de las regiones adicionales de la Inulosacarasa (*IsLA*) de *Leuconostoc citreum* CW28. Tesis de Doctorado. IBt. UNAM. 108 p.

Dewulf, E. M., Cani, P. D., Claus, S. P., Fuentes, S., Puylaert, P. G., Neyrinck, A. M., Bindels, L.B., de Vos, W. M., Gibson, G. R., Thissen, J. P. & Delzenne, N. M. (2012). Insight into the prebiotic concept: lessons from an exploratory, double blind intervention study with inulin-type fructans in obese women. *Gut*, gutjnl-2012.

Franck, A. (2002). Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, 87(S2), S287-S291.

Ganaie, M. A., Lateef, A., & Gupta, U. S. (2014). Enzymatic trends of fructooligosaccharides production by microorganisms. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(4), 2143-2159.

- Gibson, G. R., Probert, H. M., Van Loo, J., Rastall, R. A., & Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17(2), 259-275.
- Glibowski, P., & Bukowska, A. (2011). The effect of pH, temperature and heating time on inulin chemical stability. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment*, 10(2), 189-196.
- Guarner, F. (2007). Studies with inulin-type fructans on intestinal infections, permeability, and inflammation. *The Journal of nutrition*, 137(11), 2568S-2571S.
- Hinrichs, W. L. J., Prinsen, M. G., & Frijlink, H. W. (2001). Inulin glasses for the stabilization of therapeutic proteins. *International Journal of Pharmaceutics*, 215(1), 163-174.
- Karunanithy, C., Karuppuchamy, V., Muthukumarappan, K., & Gibbons, W. R. (2012). Selection of enzyme combination, dose, and temperature for hydrolysis of soybean white flakes. *Industrial Biotechnology*, 8(5), 309-317.
- Kelly, G. (2008). Inulin-type prebiotics a review: part 1. *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic*, 13(4), 315-329.
- Kolida, S., Tuohy, K., & Gibson, G. R. (2002). Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, 87(S2), S193-S197.
- Kolida, S., & Gibson, G. R. (2007). Prebiotic capacity of inulin-type fructans. *The Journal of nutrition*, 137(11), 2503S-2506S.
- López, M. G., Mancilla-Margalli, N. A., & Mendoza-Díaz, G. (2003). Molecular structures of fructans from Agave tequilana Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 7835-7840.
- Maturano, R. N. (2013). Evaluación de producción de FOS a partir de inulina de agave por tratamiento enzimático con una endoinulinasa de *Aspergillus niger* (Novozym 960®). Laboratorio 03. Tecnología Enzimática. IBt. UNAM. 15 pp.
- Maturano, R. N. (2014). Desarrollo de una bebida con potencial efecto simbiótico a partir de los azúcares presentes en plantas de agave y *Leuconostoc citrem*. UNAM. IBT. Tesis de Maestría. 117 p.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.

Moser, M., Sentko, A., & Alexiou, H. (2014). Inulin and Health Benefits. In *Polysaccharides* (pp. 1-36). Springer International Publishing.

Mutanda, T., Wilhelmi, B. S., & Whiteley, C. G. (2008). Response surface methodology: synthesis of inulooligosaccharides with an endoinulinase from *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(4), 362-368.

Mutanda, T., Wilhelmi, B. S., & Whiteley, C. G. (2015). Biocatalytic conversion of inulin and sucrose into short chain oligosaccharides for potential pharmaceutical applications. *African Journal of Science, Technology, Innovation and Development*, 7(5), 371-380.

Olivares-Illana, V., Wachter-Rodarte, C., Le Borgne, S., & López-Munguía, A. (2002). Characterization of a cell-associated inulosucrase from a novel source: A *Leuconostoc citreum* strain isolated from Pozol, a fermented corn beverage of Mayan origin. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(2), 112-117.

Olivares-Illana, V., López-Munguía, A., & Olvera, C. (2003). Molecular characterization of inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a fructosyltransferase within a glucosyltransferase. *Journal of bacteriology*, 185(12), 3606-3612.

Ortíz-Soto, M.E. (2004). Caracterización y Aplicación de Inulosacarasa de *Leuconostoc citreum* CW28. UNAM. IBT. Tesis de Maestría. 54p

Peña C., A. I. 2013. Obtención de FOS a partir de sacarosa y la inulosacarasa *IsIA4* de *Leuconostoc citreum*. Tesis de Maestría. IBt. UNAM. 82 p.

Praznik, W., Löppert, R., Rubio, J. M. C., Zangger, K., & Huber, A. (2013). Structure of fructo-oligosaccharides from leaves and stem of *Agave tequilana* Weber, var. azul. *Carbohydrate research*, 381, 64-73.

Raga-Carbajal, E. (2013). Estudios del mecanismo de elongación de levanas de SacB de *Bacillus subtilis*. UNAM. IBT. Tesis de Maestría. 60 p.

Ritsema, T., & Smeekens, S. (2003). Fructans: beneficial for plants and humans. *Current opinion in plant biology*, 6(3), 223-230.

Risso, F. V., Mazutti, M. A., Treichel, H., Costa, F., Maugeri, F., & Rodrigues, M. I. (2012). Comparison between systems for synthesis of fructooligosaccharides from sucrose using free inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. *Food and bioprocess technology*, 5(1), 331-337.

Roberfroid, M. B. (2007). Inulin-type fructans: functional food ingredients. *The Journal of nutrition*, 137(11), 2493S-2502S.

Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N., & Prapulla, S. G. (2005). Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology*, 16(10), 442-457.

Santos, A. M., & Maugeri, F. (2007). Synthesis of fructooligosaccharides from sucrose using inulinase from *Kluyveromyces marxianus*. *Food Technology and Biotechnology*, 45(2), 181.

Sannohe, Y., Fukasawa, T., Koga, J., Kubota, H., & Kanegae, M. (2008). Comparison of the Growth of Bifidobacteria in Two Culture Media Containing Either 1-Kestose (GF 2) or Nystose (GF 3). *Bioscience and microflora*, 27(1), 13-17.

Seibel, J., Moraru, R., Götze, S., Buchholz, K., Na'amnieh, S., Pawlowski, A., & Hecht, H. J. (2006). Synthesis of sucrose analogues and the mechanism of action of *Bacillus subtilis* fructosyltransferase (levansucrase). *Carbohydrate research*, 341(14), 2335-2349.

Shoaib, M., Shehzad, A., Omar, M., Rakha, A., Raza, H., Sharif, H. R., Shakeel, A., Ansari, A. & Niazi, S. (2016). Inulin: Properties, health benefits and food applications. *Carbohydrate polymers*, 147, 444-454.

Singh, R. S., Singh, R. P., & Kennedy, J. F. (2016). Recent insights in enzymatic synthesis of fructooligosaccharides from inulin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 565-572.

Srikanth, R., Reddy, C. H. S., Siddartha, G., Ramaiah, M. J., & Uppuluri, K. B. (2015). Review on production, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydrate Polymers*, 120, 102-114.

Transparencymarketresearch.com (TRIM). (2013). *Prebiotic Ingredients Market (FOS, GOS, MOS, Inulin) for Food & Beverage, Dietary Supplements & Animal Feed - Global Industry Analysis, Market Size, Share, Trends, and Forecast 2012 - 2018*. [online] Disponible en:

<http://www.transparencymarketresearch.com/prebiotics-market.html> [Recuperado el 16 Dic. 2015].

Velázquez-Hernández, M. L., Baizabal-Aguirre, V. M., Bravo-Patiño, A., Cajero-Juárez, M., Chávez-Moctezuma, M. P., & Valdez-Alarcón, J. J. (2009). Microbial fructosyltransferases and the role of fructans. *Journal of applied microbiology*, 106(6), 1763-1778.

Vervoort, L., Van den Mooter, G., Augustijns, P., Busson, R., Toppet, S., & Kinget, R. (1997). Inulin hydrogels as carriers for colonic drug targeting: I. Synthesis and characterization of methacrylated inulin and hydrogel formation. *Pharmaceutical research*, 14(12), 1730-1737.

Vijn, I., & Smeekens, S. (1999). Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant physiology*, 120(2), 351-360.