



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DE UN SISTEMA ENZIMÁTICO PARA LA
PRODUCCIÓN DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA:

Luis Antonio Rodríguez Solís



Ciudad de México.

2018



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Hermilo Leal Lara**
VOCAL: **Profesor: Oscar Hernández Meléndez**
SECRETARIO: **Profesor: Carmina Montiel Pacheco**
1er. SUPLENTE: **Profesor: Hiram Fernando Ramírez Cahero**
2° SUPLENTE: **Profesor: Jonathan Trapala Reyna**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO 314, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA,
CONJUNTO “E”, FACULTAD DE QUÍMICA, CIRCUITO DE LA INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA S/N, CIUDAD UNIVERSITARIA, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Carmina Montiel Pacheco

SUSTENTANTE:

Luis Antonio Rodríguez Solís

**Agradezco el financiamiento y la beca otorgada para la
realización de este trabajo a DGAPA proyecto PAPIIT IA204118.
Así como a la Facultad de Química PAIP 5000-9153.**

INDICE

Introducción	6
Antecedentes	8
<i>Carbohidratos</i>	8
<i>Oligosacáridos</i>	8
<i>Tipos de oligosacáridos</i>	10
<i>Fructooligosacaridos (FOS)</i>	11
<i>Inulinasas</i>	13
<i>Mezcla de inulinasas Novo 960</i>	15
<i>Inmovilización enzimática.</i>	18
Hipótesis	20
Objetivo General	20
<i>Objetivos particulares</i>	20
Metodología	21
<i>Determinación de las condiciones de la reacción de transfructosilación.</i>	21
<i>Cuantificación de azúcares reductores por el método DNS</i>	21
<i>Evaluación de la formación de productos por cromatografía en capa fina (TLC)</i>	22
<i>Inmovilización la mezcla de inulinasas</i>	22
<i>Actividad de la mezcla inmovilizada en esferas de PVA-PEG</i>	23
<i>Ciclos de reusó de la enzima inmovilizada en esferas de PVA-PEG</i>	23
<i>Determinación de la Termo estabilidad del inmovilizado y enzima libre</i>	23
<i>Determinación de la reacción de transfructosilación con otros azúcares</i>	24
Resultados y discusión	25
<i>Determinación de la concentración de enzima</i>	25
<i>Reacción de hidrólisis catalizada por mezcla de las inulinasas Novo 960</i>	26
<i>Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática y producción de FOS</i>	31
<i>Actividad de transfructosilación con la adición de Glucosa y Fructosa.</i>	38
<i>Efecto del inmovilizado en la producción de FOS</i>	41
• <i>Sistema enzimático en inmovilizado para la producción de FOS</i>	42

• <i>Ciclos de utilidad del inmovilizado PEG-PVA</i>	44
Conclusiones.	48
Perspectivas.	48
Referencias.	49

Introducción

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (mundialmente conocida como FAO) un alimento es un producto natural o elaborado, susceptible de ser ingerido y digerido, cuyas características lo hacen apto y agradable al consumo, constituido por una mezcla de nutrientes y nutrimentos que cumplen determinadas funciones en el organismo. Existen alimentos llamados “funcionales” que están diseñados para proveer un beneficio específico para la salud más allá de la nutrición básica, es muy conocido que varios alimentos funcionales son añadidos con los probióticos y prebióticos. Los probióticos son microorganismos vivos que confieren un beneficio a la salud del huésped (humano) cuando se administran en cantidades adecuadas, mientras que los prebióticos son compuestos que los probióticos transforman en otros compuestos que tienen un beneficio para la salud del ser humano (FAO 2017).

Los ingredientes con propiedades prebióticas se encuentran en los polisacáridos y los oligosacáridos que habitualmente forman parte de la dieta humana y animal. Entre los oligosacáridos con potencial prebiótico se encuentran los fructooligosacáridos (FOS). Los FOS son hidratos de carbono compuestos principalmente por fructosa y en algunos escasos residuos de glucosa (Chacón, 2006). Son también conocidos como fructanos, oligofructanos, glucofructanos, etc., cuya estructura se encuentra formada por uniones repetitivas de disacáridos tales como sacarosa, inulobiosa y levanobiosa.

Los FOS son fructosil polímeros que consisten en cadenas lineales de D-fructosa (aunque se pueden observar diferentes grados de ramificación de acuerdo con la complejidad), presentan un enlace β (2-1) y usualmente tienen una molécula de D-glucosa terminal unida a una fructosa por un enlace α (2-1). La presencia del enlace β (2-1) hace que los FOS no sean digeribles como lo sería cualquier hidrato de carbono típico, lo que a su vez tiene como consecuencia que tengan un bajo valor calórico y una funcionalidad como fibra dietética (Niness, 1999).

Los FOS pueden ser obtenidos por síntesis química o enzimática, el primer método presenta inconvenientes debido a los bajos rendimientos (60%), gran variabilidad de FOS debido a la inespecificidad de la reacción y polimerizaciones.

Mientras que, por síntesis enzimática se producen compuestos con enlaces glucosídicos β y con rendimientos de casi 100%, ya sea, por hidrólisis parcial enzimática (endoinulinasa) de la inulina original o también la transfructosilación enzimática de sacarosa.

El objetivo de este trabajo es emplear una mezcla de enzimas (exo y endoinulinasas) Novozyme 960 (Producidas por *Aspergillus niger*), para favorecer la síntesis de FOS a partir de sacarosa. Se busca proponer las condiciones de pH, sustrato adecuado y cantidad de enzima para que la reacción de síntesis (transfructosilación) sea favorable. De igual manera como método adicional para la reacción, con la enzima inmovilizada se tendrían ventajas de reutilización de la enzima evitando así pérdidas de la misma.

Antecedentes

Carbohidratos

Los carbohidratos son los compuestos orgánicos más abundantes de la tierra, desempeñan un papel central en el metabolismo de vegetales y de animales. Estos compuestos pertenecen al grupo de nutrientes básicos y son la fuente de energía más importante en los seres vivos (Belitz, et al, 2011). Estos se clasifican como simples (monosacáridos) y complejos. Un monosacárido: no puede ser hidrolizado a moléculas más pequeñas, todos ellos son azúcares reductores ("Azúcares" que tienen un carbono anomérico con un grupo aldehído o cetona potencial libre, es decir, que su grupo carbonilo está disponible para formar un enlace. (Harper, 2012. Figura 1).

Los monosacáridos o mejor conocidos como azúcares simples se clasifican adicionalmente como aldosas y cetosas según el tipo de grupo carbonilo presente en la molécula, ya sea éste un aldehído o una cetona (McMurry, et al J., 2008).

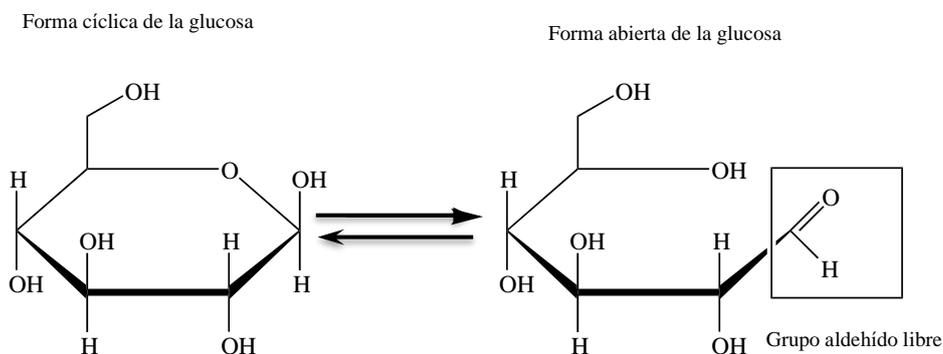


Figura 1. Azúcar reductor.

Los carbohidratos complejos están formados de dos (disacáridos) o más (polisacáridos) azúcares simples unidos entre sí, por un enlace tipo acetal (glicosídico). Dependiendo del grado de "polimerización" y ramificaciones los polisacáridos son clasificados en distintos tipos, uno de estos tipos son los oligosacáridos.

Oligosacáridos

Los oligosacáridos son azúcares combinados que presentan de tres a veinte unidades de monosacáridos, reciben el nombre de oligosacáridos. Estas

unidades pueden ser iguales o diferentes, algunos autores nombran oligosacáridos a los disacáridos puesto que también son de “cadena corta”

Se pueden obtener por la hidrólisis de los polisacáridos. Durante la síntesis de los oligosacáridos, uno de los azúcares debe perder un hidroxilo anomérico para poder formar el enlace glucosídico (Murray R., et al 2013). En caso de que los dos monosacáridos estén unidos a través de sus respectivos carbonos anoméricos, forman un azúcar no reductor Figura 2.

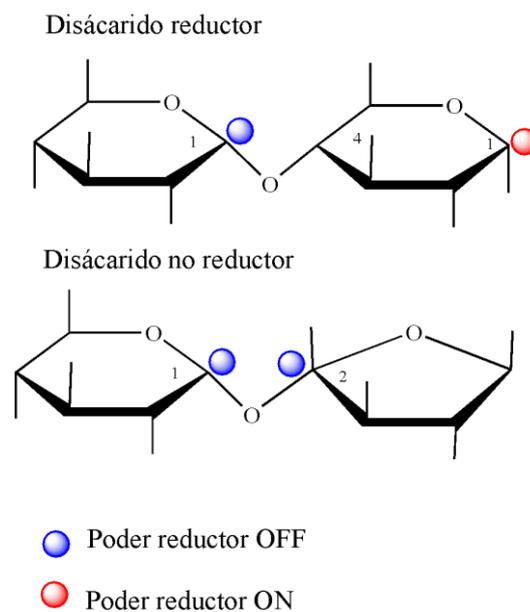


Figura 2. Azúcar no reductor.

Los oligosacáridos suelen tener cierta intensidad de dulzor, que generalmente disminuye conforme aumenta la longitud de la cadena, estos a su vez son solubles en agua (Belitz, 2011). La estructura molecular, resiste a la digestión en la parte superior del intestino (intestino delgado), lo que evita su absorción y le permite continuar su recorrido intestinal hasta llegar al colon, donde se convierte en alimento para las bacterias que estén presentes allí, eso permite el uso de los oligosacáridos como prebiótico, estos compuestos tienen principalmente un origen vegetal, pero también pueden ser encontrados en hongos y bacterias, todo depende de la fuente de donde se obtengan, así como el tipo de enlaces que forman para darle sus propiedades únicas (Sudhir P., et al, 2017).

Tipos de oligosacáridos

Como ya se mencionó la estructura de los oligosacáridos, incluida la naturaleza de los enlaces glicosídicos, su solubilidad, viscosidad, fermentabilidad y grado de polimerización son coordenadas importantes para determinar la funcionalidad de un prebiótico. Los prebióticos son útiles para minimizar los riesgos relacionados con la salud, como la diabetes, los trastornos cardiovasculares, el cáncer, las infecciones agudas, la inflamación y la obesidad. El consumo de prebióticos también mejora la biodisponibilidad de minerales nutricionalmente importantes como calcio, magnesio y hierro. Diferentes microorganismos probióticos emplean diferentes mecanismos genéticos para utilizar diferentes tipos de oligosacáridos; por lo tanto, el grado de eficacia de las fibras dietéticas en la salud depende del tipo de biomolécula prebiótica consumida (Sudhir P., 2017). La siguiente tabla muestra algunos diferentes tipos de oligosacáridos y de manera natural donde encontrarlos (Tabla 1 y 2).

Tabla 1 Tipos de oligosacáridos

Categoría	Secuencia molecular	Naturaleza de la unión glucosídica	Presencia
Fructooligosacáridos	G-(F) _n	β (2-1) / β (2-6)	Espárragos, remolacha, ajo, achicoria, cebolla, alcachofa de Jerusalén, trigo, miel, plátano, cebada, tomate, agave
Galactooligosacáridos	G-(Ga) _n	β (1-3) y β (1-4)	Leche
Isomaltooligosacáridos	(G) _n	α (1-6)	Miel, jugo de caña, melaza
Isomaltulosa	(GF) _n	α (1-6)	
Lactosacarosa	Ga-GF	β (1-4) y α (1-2)	
Maltooligosacáridos	(G) _n	α (1-4)	
Ciclodextrina	(G) _n	α (1-4)	Almidón

Xylooligosacárido	(X) _n	β (1-4)	Brotos de bambú, cáscaras, paja, maíz
Estaquiosa	(Ga) ₂ -GF	α (1-6) y α (1-2)	Soja y otras legumbres
Arabinooligosacárido	(A) _n	α (1-5)	
A) arabinosa, G) glucosa, F) fructosa, Ga) galactosa, X) xilosa			

(Modificada de Sudhir p. Singh, *Prebiotic Oligosaccharides: Special Focus on Fructooligosaccharides, Its Biosynthesis and Bioactivity*)

Fructooligosacáridos (FOS)

Uno de los grupos de oligosacáridos que ha tomado fuerza en los últimos años son los llamados fructooligosacáridos (FOS), estos son oligosacáridos con un grado de polimerización menor a 20 (los productos comerciales contienen un valor medio de 9). Los FOS están constituidos por unidades de fructosa unidas entre sí por un enlace β (2-1) y una glucosa terminal con enlace α (2-1) (Sungsoo, *et al.*, 1999. Figura 3).

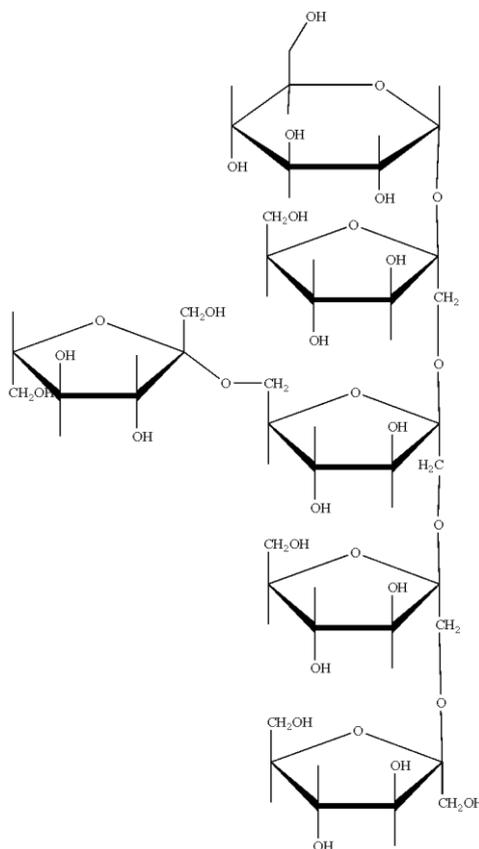


Figura 3. Estructura de los FOS proveniente de inulina.

Al incrementarse el consumo de FOS se modula la composición de la microbiota en el colon, estimulando el crecimiento bacterias benéficas, especialmente del género *Bifidobacterium* (Biedrzycka, *et al.*, 2004). Por ello los efectos indirectos del consumo de FOS sobre la salud son varios, puesto que las bacterias colónicas fermentan estos carbohidratos dietéticos no digeribles, produciendo una amplia gama de metabolitos en el intestino, por ejemplo, ácidos grasos de cadena corta. Los ácidos grasos volátiles de cadena corta (1-6) lineales o ramificados, tienen implicaciones fisiológicas cruciales, como la reducción concomitante del pH luminal que inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos, la señalización del huésped y las interacciones bacterianas de alimentación cruzada (Sudhir P., 2017).

Los FOS también tienen aplicaciones industriales, que abarcan la sustitución de grasas al incluirse como ingrediente de mayonesas ligeras y quesos bajos en calorías; contribuyen a la reducción del contenido calórico y la retención de agua (industria de repostería y embutidos); evitan la formación de grandes cristales (helados) su funcionamiento en general es modificar las propiedades reológicas de algunos alimentos, también su utilización como un edulcorante de bajo contenido calórico puesto que la inulina tiende a ubicarse en promedio en 1.6-2 Kcal/g (Chacón V, 2006) por su fácil incorporación y buenas propiedades organolépticas.

Los FOS se extraen generalmente de vegetales como la achicoria, agave, alcachofa, etc., donde se tratan por molienda y solubilización en agua caliente, para posteriormente usar una mezcla de enzimas las cuales incluyen sacarasas, amilasas, maltasas, inulinasas para hidrolizar a los polisacáridos que se encuentran en dichas matrices. Los azúcares resultantes se eliminan por lavado con etanol al 80% v/v, o bien, a través de elución por una columna de intercambio iónico (Chacón V., 2006). En pocas palabras la utilización de enzimas para producir FOS es de suma importancia, el grupo más estudiado para obtener FOS son las inulinasas.

Inulinasas

Las enzimas que hidrolizan los enlaces β de la inulina para formar FOS se les conoce como inulinasas y se clasifican dentro del grupo de las hidrolasas, cuyo nombre sistemático es 1- β -D fructan fructohidrolasa, y su reacción es la endohidrólisis de los enlaces (2-1)- β -D-fructosídicos. Estas enzimas pueden dividirse en endo- y exo-inulinasas. Las endo-inulinasas hidrolizan los enlaces internos de la inulina para producir principalmente inulotriosa-pentosa mientras que las exo-inulinasas hidrolizan el extremo no reductor de la inulina para producir fructosa (Chi et al. 2009). Las inulinasas son producidas por plantas y microorganismos, siendo estos últimos los mayores productores de enzimas. Entre los microorganismos capaces de producir altas concentraciones de inulinasas se encuentran los hongos como *Aspergillus niger* (Tabla 3) (Sudhir P., 2017).

Tabla 3. Microorganismos productores de inulinasas.

Tipo de inulina	Microorganismo
Exoinulina	<i>Bacillus polymyxa MGL₂₁</i>
	<i>Bacillus licheniformis</i>
	<i>Bifidobacterium longum</i>
	<i>Bacillus sp.</i>
	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
	<i>Penicillium sp. TN-88</i>
	<i>Pseudomonas mucidolens</i>
	<i>Thermotoga maritima</i>
Endoinulina	<i>Aspergillus awamori</i>
	<i>Aspergillus ficuum</i>
	<i>Arthrobacter sp. S37</i>
	<i>Aspergillus niger</i>
	<i>Penicillium sp. TN-88</i>
	<i>Penicillium purpurogenum</i>

(Modificada de Sudhir p. Singh, Prebiotic Oligosaccharides: Special Focus on Fructooligosaccharides, Its Biosynthesis and Bioactivity)

Las enzimas que llevan a cabo la síntesis enzimática de FOS usando sacarosa como sustrato se conocen como fructosiltransferasas (FTasas) (EC 2.4.1.99) o β -fructofuranosidasas (EC 3.2.1.26) (Antosova, 2002). La naturaleza de los FOS también puede variar dependiendo de las condiciones de reacción y del tipo de enzima que se use. Algunas FTasas catalizan la síntesis de FOS solamente, pero no del polímero (Linde, 2012). La FTasa de *Aspergillus aculeatus* cataliza la síntesis de FOS de cadena corta (kestosa, nistosa y fructosilnistosa), mientras que la levansacarsa no solo sintetiza FOS sino que también produce polímeros de fructosa, llamados levanos (Ghazi, 2007). Las FTasas poseen actividades tanto hidrolíticas como de transfructosilación, dependiendo de la concentración de sacarosa. En caso de una alta concentración de sacarosa, se ha observado un aumento de la actividad de transfructosilación (Fernández, 2017). La extensión de las actividades hidrolíticas o de transfructosilación difiere con las enzimas. Las FTasas se han reportado en plantas, bacterias y hongos, las enzimas de estos difieren debido a quien es el que la produce (sean plantas o microorganismos). Existe una estructura de Rayos X de una exo- inulinasa proveniente de *Aspergillus awamori*, la estructura terciaria de esta enzima se pliega en dos dominios: el dominio catalítico N-terminal de un inusual doble hélice de cinco palas y el dominio C-terminal plegado en una estructura similar a un sándwich β , (Nagem et al. 2004) presentada como la **Figura 4**, y una estructura cristalina de una endoinulinasa proveniente de *Aspergillus ficuum* presenta una disposición bimodular común a otras enzimas GH32: un dominio catalítico de hélices β de 5 veces N-terminal con cuatro láminas β y un C-terminal Dominio β -sándwich organizado en dos hojas β con cinco cadenas β observada en la **Figura 5** (Pouyez J., et al, 2012).

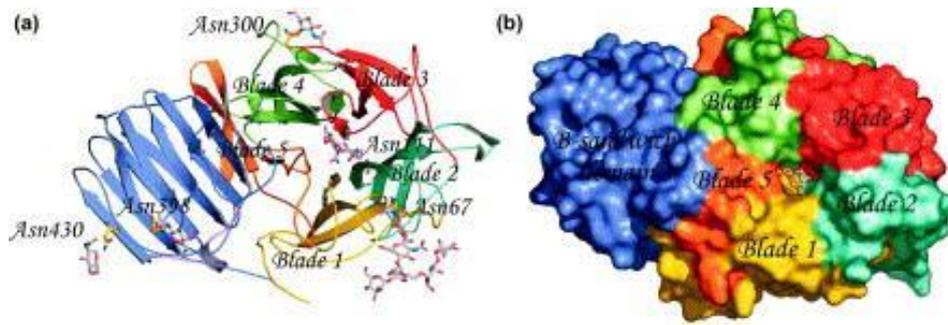


Figura 4. (a) Representación estructural secundaria de exo-inulinasa. (b) Representación de la superficie de exo-inulinasa. Tomado de Nagem, 2004

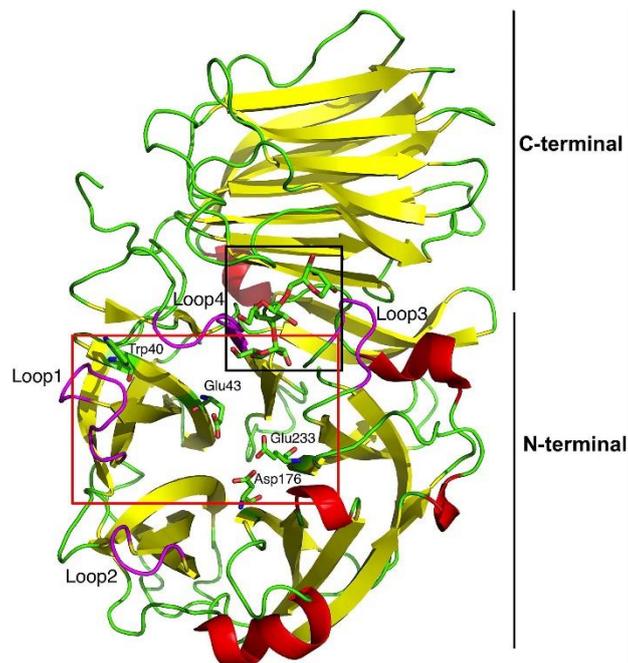


Figura 5. Endo-inulinasa INU2 de *A. ficuum* con su sitio activo en el cuadro rojo. Los bucles cercanos a este sitio se representan en magenta y se denominan loop1 a loop4. Las moléculas de manosa se representan en la caja negra. Las láminas β y las hélices están coloreadas en amarillo y rojo, respectivamente. Tomado de (Pouyez J., 2012).

Mezcla de inulinasas Novo 960

El combinado enzimático de endo y exoinulinasas Novo 960 para obtener FOS viene de un microorganismo del género *Aspergillus*, por ello es importante saber que es un hongo filamentoso, saprofito, perteneciente al filo *Ascomycota*. Se encuentra formado por hifas hialinas septadas y puede tener reproducción sexual (con formación de ascosporas en el interior de ascas) y asexual (con formación de conidios) (Bonifaz J., et al., 2010)

Las diferentes especies se diferencian en tamaño, tasa de crecimiento, textura (aterciopelada, granular, algodonosa) y color de la colonia (negro para *A. niger*).

La coloración aparece casi siempre en todas las estructuras aéreas, tanto en el micelio como en las cabezas conidiales (Bonifaz J., 2010)

Comercialmente, la producción de FOS se lleva a cabo principalmente a partir de sacarosa mediante la actividad de transfructosilación de β -fructofuranosidasas (Hirayama et al., 1989; Ghazi et al., 2007; Kurakake et al., 2010). A nivel industrial se utilizan las enzimas de diferentes especies de *Aspergillus*, se considera al hongo *Aspergillus niger* como el microorganismo de producción de enzimas más eficiente para la producción de FOS (Yanai, *et al.*, 2001; Trollope et al., 2015). A nivel industrial como ya se mencionó a partir de la sacarosa por una actividad de transfructosilación de la β -fructofuranosidasas (Ffase, EC 3.2.1.26) (Hirayama, 1989; Ghazi, 2007; Kurakake, 2010).

Transfructosilación

Actualmente, los FOS disponibles comercialmente para el consumo humano son exclusivamente prebióticos de tipo inulina con enlaces β (2-1) , tales como 1-kestosa y nistosa (Figura 6); todos los cuales pueden ser producidos a partir de sacarosa por la acción de la fructosiltransferasa (FTasa). Las FTasas se encuentran en muchas plantas y microorganismos. La Figura 7 representa como se lleva a cabo la síntesis de oligosacáridos utilizando diferentes FTasas.

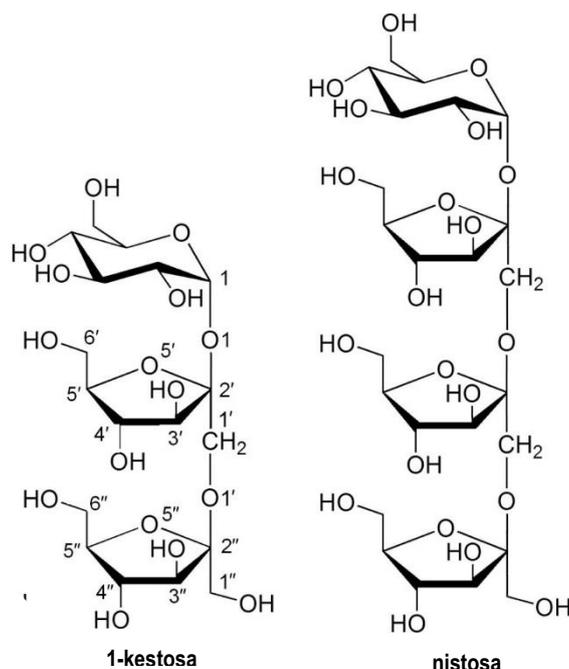


Figura 6. Oligosacáridos de cadena corta sintetizados por FTasas.

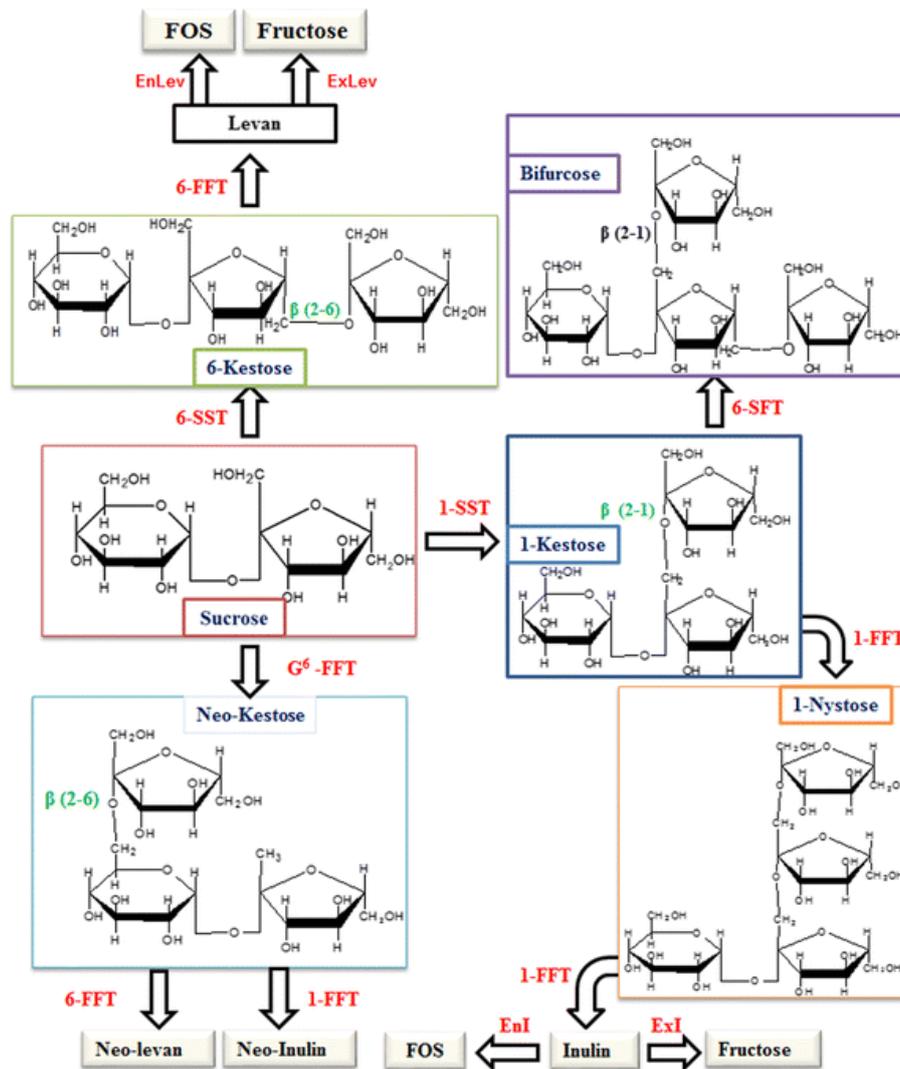


Figura 7. Producción de fructanos. Sacarosa 1-SST: sacarosa 1-fructosiltransferasa, 1-FFT: fructano 1-fructosiltransferasa, sacarosa 6-SST: sacarosa 6-fructosiltransferasa, 6-FFT fructano: fructano 6-fructosiltransferasa, G⁶ FFT fructano:fructano 6G-fructosiltransferasa, 6-SFT sacarosa:fructano g-fructosiltransferasa, exI exoinulinasa, EnI endoinulinasa, EnLev endolavanasa, ExLev Exolevanasa. Tomado de (Sudhir P., 2017).

Los sustratos aceptores naturales de las FTasas de origen fúngico incluyen sacarosa, 1-kestosa y nistosa. La enzima actúa sobre el sustrato donante de un grupo fructosilo proveniente de la sacarosa a través de un mecanismo catalítico de retención y se demostró que tiene una alta actividad de transfructosilación. Sin embargo, en general, los FT conservan enzimas que tienen un alto potencial para sintetizar FOS por transfructosilación. La estructura de FT comprende de dos dominios, con un dominio catalítico N-terminal que contiene una β -hélice unido a un dominio β -sandwich C-terminal, que contiene el sitio activo. (Jintonom J., et al. 2018)

La reacción tiene lugar a través de un mecanismo de doble desplazamiento con retención de la configuración anomérica del resto fructosilo. Escisión del enlace glucosídico la sacarosa sustrato donante Fru-glu (2-1) , donde para dar como resultado la formación de un enlace covalente enzima α -fructosil intermedio y la liberación de glucosa. Posteriormente, la unidad de fructosilo puede transferirse a agua o sustratos aceptor tales como sacarosa, lo que conduce a la generación de fructosa o 1-kestosa como producto final, respectivamente (propuesto por Jitrayut Jitonnorn, Figura 8).

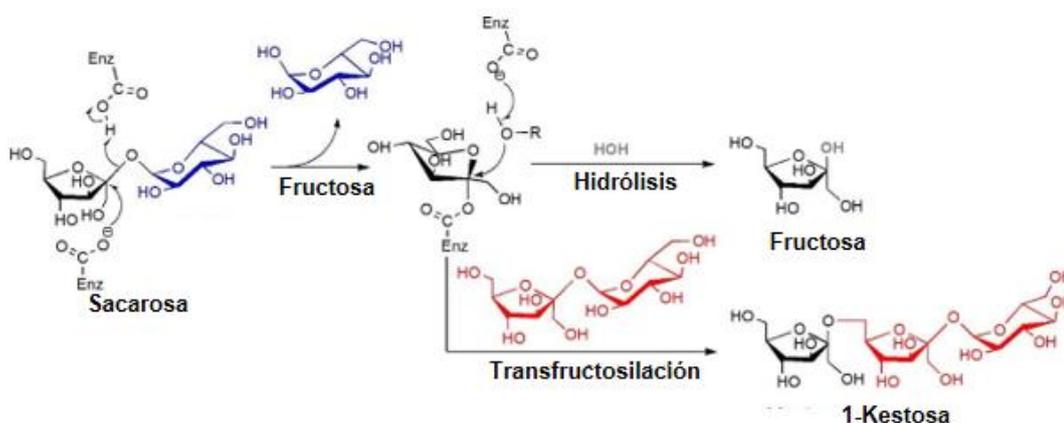


Figura 8. Mecanismo de reacción con sacarosa (Modificado de Jitrayut Jitonnorn, QM/MM modeling of the hydrolysis and transfructosylation reactions of fructosyltransferase from *Aspergillus japonicus*, an enzyme that produces prebiotic fructooligosaccharide, Journal of Molecular Graphics and Modelling.)

Inmovilización enzimática.

Una de las formas para mejorar los procesos biotecnológicos es la inmovilización enzimática, la cual pretende la recuperación del medio de reacción y poder reutilizarlas. El término enzima inmovilizada, puede ser definido como un sistema o preparación en el cual una enzima es fijada en una región definida en el espacio. La enzima puede ser fijada por diferentes mecanismos, ya sea de soporte líquido o en medio sólido (retención física) o bien mediante atrapamiento en matrices porosas. Este atrapamiento puede ser en geles o en fibras.

Además de permitir recuperar enzimas se tienen ventajas adicionales como son el diseño de reactores enzimáticos, mejora de la estabilidad y rigidez de la enzima, previene la inactivación enzimática en disolventes orgánicos y puede

generar procesos mucho más rentables (Arroyo M., et al., 1998). Pero como en cualquier técnica tiene sus desventajas como son; alteraciones de la conformación de la enzima o la pérdida de cierto porcentaje de la actividad enzimática, esto dependiendo de las condiciones de reacción y del método de inmovilización.

Uno de los métodos de inmovilización enzimática es el atrapamiento, que consiste en la retención física de la enzima en las cavidades de una matriz sólida constituida generalmente por prepolímeros fotoentrecruzables o polímeros de poli(acrilamida), colágeno, alginato, carraginato o resinas de poli(éterano). El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución del monómero, Seguido una polimerización por un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico, por ello se requiere de un control riguroso de las condiciones de polimerización, así como la comprobación de que la naturaleza química del proceso no altera los grupos reactivos de la proteína (Arroyo,1998)

El gel de alcohol polivinílico (PVA por sus siglas en inglés) Polietilenglicol (PEG), (PVA-PEG) es un sistema macroporoso de redes interpenetradas (Figura 9) estabilizadas por interacciones físicas. Tener un medio de este tipo presenta sus ventajas como un aumento de la estabilidad de la enzima, una posible reutilización de la enzima que disminuye costos de manera directa, de igual manera presenta sus desventajas, como una alteración en la conformación de la enzima, una gran heterogeneidad en la matriz enzima-soporte, se puede perder actividad enzimática.

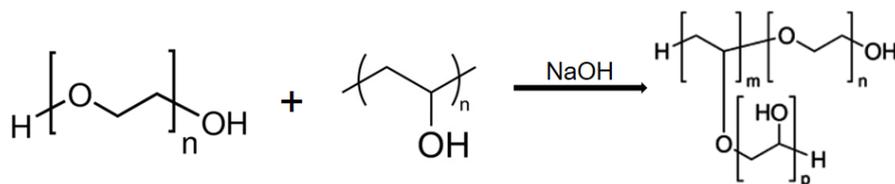


Figura 9. Estructura de PVA-PEG

Hipótesis

La mezcla de endo y exo-inulinasas conocida como Novozym 960 mediante el uso de sacarosa y fructosa como sustratos debe ser capaz de realizar transfructosilación para la síntesis de fructooligosacáridos.

Objetivo General

- Establecer las condiciones que favorezcan la reacción de transfructosilación empleando a la mezcla Novozym 960 como biocatalizador.

Objetivos particulares

- Determinar que sustratos favorecen la síntesis de FOS.
- Establecer las mejores condiciones de transfructosilación (Temperatura y pH).
- Reutilizar a la enzima Novozym 960 mediante su inmovilización en una matriz PVA-PEG.
- Evaluar la estabilidad de la enzima inmovilizada.

Metodología

Determinación de las condiciones de la reacción de transfructosilación.

Como condiciones iniciales en este trabajo se estableció el uso de diferentes concentraciones de sacarosa 1, 2, 3, 5, 7, 10 y 12 % (m/v) en una solución amortiguadora de acetatos pH 5 con una concentración 50 mM a una temperatura de 50°C (previamente determinado en el grupo de trabajo). La reacción se inició con 5 o 10 µL de enzima (2 o 4 µg/ µL de proteína).

Las reacciones se llevaron a cabo en matraces de 50 mL con tapón de rosca marca pyrex, en un volumen total de 30 mL, bajo las condiciones antes descritas, a 120 rpm. Se usaron 2 controles de la reacción, uno de solo la enzima y otro sólo con sacarosa, para observar si es que existen azúcares reductores adheridos a la mezcla de enzimas y a su vez evaluar la posible hidrólisis química de la sacarosa. Se tomaron muestras de 0.6 mL a diferentes intervalos de tiempo, la reacción se detuvo a través de la congelación de cada una de las muestras usando hielo seco y acetona, para posteriormente almacenarlas a -80°C hasta su análisis. El descongelamiento se lleva a cabo en un baño de hielo para evitar avance de reacción.

Cuantificación de azúcares reductores por el método DNS

Las muestras se descongelaron en hielo, para evitar el avance de la reacción. No se empleó temperatura para evitar reacciones de degradación de los carbohidratos. En tubos de ensayo de 12x100 con tapón de rosca, se colocan 100 µL de la muestra de reacción, 200 µL de buffer de acetatos pH 5 y 600 µL de reactivo de DNS, los tubos se calentaron a 90°C en baños de glicerol en parrillas marca IKA RCT basic por 5 min, la reacción se detuvo en un baño de hielo por 20 min. Posteriormente se adicionaron 4 mL de agua destilada y se midió la absorbancia en un espectro Thermo scientific Genesys 10S UV-VIS a 540 nm. Para cuantificar los azúcares reductores se utilizó como referencia una

curva patrón de fructosa y así poder medir la velocidad de reacción ya sea de hidrólisis o de transfructosilación,

Evaluación de la formación de productos por cromatografía en capa fina (TLC)

Con la finalidad de observar los productos de reacción se realizó el análisis cualitativo de la hidrólisis y posible formación de FOS por medio de la técnica de cromatografía en capa fina (TLC). Como fase estacionaria se empleó gel de sílice y dos fases móviles una con butanol, metanol, agua, ácido acético glacial en proporción 3:3:1:0.2 y otra con butanol, isopropanol, agua en proporción 7:5:4 respectivamente. Las cromatoplasmas fueron reveladas con una solución de H₂SO₄ 5% (v/v) en metanol y 10 mg de orcinol por cada mL de solución.

Inmovilización la mezcla de inulinasas

La inmovilización se llevó a cabo en una matriz de alcohol polivinílico y polietilenglicol (PVA-PEG) en una proporción de 10-10 (% m/v) en 15 mL de agua, calentado hasta 90°C para que ambos compuestos se disolvieran evitando la formación de burbujas. Posteriormente se enfrió lentamente hasta alcanzar 40°C para adicionar 1 mL de NaOH 7M, dejando que ocurra una reacción de saponificación por 30 min, posteriormente se ajustó a un pH de 5 con una solución concentrada de HCl (7 M). Con el pH ajustado se adicionó 1 mL de la enzima (14.1 mg de proteína) dejando mezclar durante 10 min. Con el copolímero-enzima, se gotea en aceite de silicón a -70 °C para obtener las esferas de PVA-PEG con enzima atrapada, éstas se almacenan a 4°C durante 24h. Se hicieron 2 lavados con hexano para eliminar los residuos de aceite de silicón y 4 lavados con buffer de acetatos 50 mM pH 5. La concentración final de enzima aproximada es 5.12 µg proteína/esfera.

Actividad de la mezcla inmovilizada en esferas de PVA-PEG

La reacción se llevó a cabo en matraces de 50 mL con tapón de rosca marca pyrex, con un volumen total de 30 mL de sacarosa 10% m/v pH 5 colocando 10 esferas de inmovilizado PVA-PEG (51.2- 53.5 μ g de proteína) para iniciar la reacción, con una temperatura 50°C y agitación orbital a 120 rpm. Se utilizó un control de la reacción sólo con sacarosa, para evaluar la posible hidrólisis química de la sacarosa. Tomando muestras de 0.5 mL a diferentes intervalos de tiempo, las muestras se almacenaron en un ultra congelador (REVCO) a -80°C hasta su análisis. El descongelamiento se lleva a cabo en un baño de hielo para evitar avance de reacción.

Ciclos de reuso de la enzima inmovilizada en esferas de PVA-PEG

Se colocan 10 mL de una solución de sacarosa al 10% m/v pH 5 en un matraz de 50 mL con tapón de rosca a este se añadieron 4 esferas (aproximadamente 20.5 μ g proteína) para comenzar la reacción, a 50°C con agitación orbital de 120 rpm tomando 500 μ L de muestra a los tiempos 0, 30 min. Una vez terminado el tiempo se retiran las esferas del medio y se les hacen tres lavados con 1 mL de buffer de acetatos pH 5, posteriormente se agregan las esferas a un medio nuevo (10 mL sacarosa 10% m/v, pH 5) para llevar a cabo la reacción nuevamente (50°C, 120rpm). Todo esto se repite hasta lograr los ciclos de interés.

Determinación de la Termo estabilidad del inmovilizado y enzima libre

Se colocan 500 μ L de buffer de acetatos pH 5 en microtubos de plástico de capacidad 1.5 mL, a los cuales se les agregó 5 μ L de la mezcla de enzima en solución (enzima libre) y aproximadamente 53.5 μ g de proteína en PVA-PEG(enzima inmovilizada). La enzima en buffer se llevó, durante 2h, a temperatura constante (40, 50 y 60 °C) e inmediatamente, el contenido de los microtubos es adicionado en matraces 50 mL que contienen el medio: 10% m/v sacarosa, pH 5 a 50°C para hacer la reacción durante 30 min. y medir el efecto

de la temperatura en la actividad aparente de la enzima sobre la sacarosa mediante cuantificación de azúcares reductores (DNS).

Determinación de la reacción de transfructosilación con otros azúcares

Con la finalidad de evaluar los sustratos con los cuales se puede llevar a cabo la reacción de transfructosilación se usaron las condiciones antes descritas, cambiando el sustrato de reacción.

Las reacciones se llevaron a cabo en matraces de 50 mL con tapón de rosca marca pyrex, con un volumen total de 30 mL para la reacción, bajo las condiciones antes descritas, con agitación orbital a 120 rpm. Se utiliza un control de reacción único para cada reacción con los azúcares que se utilizaron para cada una, como sustrato se utilizaron glucosa, fructosa y sacarosa en las siguientes combinaciones:

Tabla 4. Medio de reacción pH 5, 50°C, 5 μ L de enzima.

	Sacarosa [% m/v]	Glucosa [% m/v]	Fructosa [% m/v]
I	10	1	-
II	10	-	1
III	-	-	10
IV	10	1	1

Se tomaron muestras de 0.6 mL a diferentes intervalos de tiempo, la reacción se detiene a través de la congelación de cada una de las muestras usando hielo seco y acetona para su inmediata congelación, para posteriormente almacenarlas a -80°C hasta su análisis. El descongelamiento se lleva a cabo en un baño de hielo para evitar avance de reacción.

Resultados y discusión

Determinación de la concentración de enzima

Para medir la cantidad de enzima utilizada en la reacción debido a su importancia en la catálisis, se cuantificó la concentración de proteína por el método de Bradford. Esto es parte fundamental puesto que, para caracterizar una enzima, la cantidad de esta es de suma importancia, ya que todo se modela a partir de la concentración de proteína. Para determinar dicha concentración se usó una curva patrón de albumina sérica bovina (BSA), obteniendo la ecuación de la recta que permitió el cálculo de la concentración de enzima

$$mg/ml_{enzima} = \frac{ABS_{595nm} - 0.084}{1.128}$$

Utilizando dicha ecuación la concentración de enzima es de 1.91 μ g/mL de mezcla Novo 960. Inicialmente las reacciones se llevaron a cabo utilizando 10 μ L de enzima y posteriormente la cantidad se ajustó a la mitad (5 μ L). La reacción en este punto se realizó con 3 diluciones de la enzima 1:100, 1:50 y 1:10, ninguna de las reacciones resultó favorable para la síntesis de FOS, debido a que pasados los 30 minutos de reacción, la concentración de azúcares reductores fue muy baja, lo cual indica que la cantidad de enzima no es suficiente para llevar a cabo la reacción de una manera efectiva. Esto provocó que la producción de FOS sea baja o casi nula, ya que éstos necesitan a la fructosa para esta síntesis, si ésta no está presente no puede llevarse a cabo. La Figura 10, muestra la TLC de la reacción con dilución (1:10) después de las 24 h donde se tiene una concentración de azúcares reductores menor al 0.1 g/mL y solo se puede apreciar claramente el punto de la presencia de sacarosa.

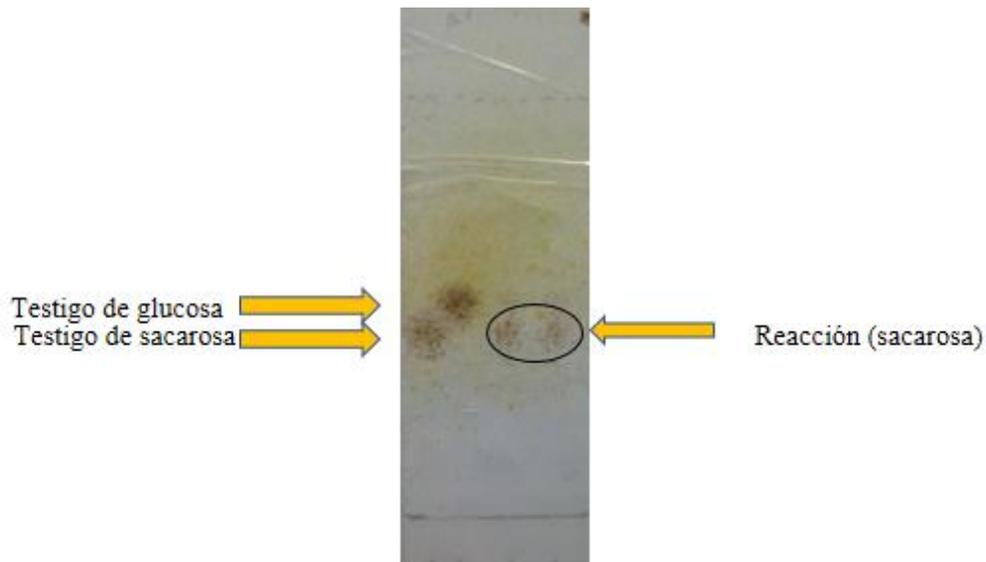


Figura 10. Avance de reacción de le enzima diluida 1:10. Fase móvil
butanol:metanol:agua:ac. acetico (3:3:1:0.2)

Reacción de hidrólisis catalizada por mezcla de las inulinasas Novo 960

Con la finalidad de cuantificar los azúcares reductores producto de la reacción enzimática, se construyó una curva patrón de fructosa. Puesto que la sacarosa no es un azúcar reductor, al avanzar la reacción en el sistema enzimático se observó un incremento en la concentración de azúcares reductores, el cálculo se hizo usando la siguiente ecuación, donde:

$$Abs_{540nm} = 1.263(C_{AR})$$

Abs_{540nm} = absorbancia determinada a 540 nm

C_{AR} = Concentración de azúcares reductores

Como se puede observar en la Figura 11, hay producción de azúcares reductores, lo que podría indicar, que efectivamente se está llevando a cabo la reacción de hidrólisis, aunque no se descartaría también una posible transfructosilación. Y la figura 12 muestra cualitativamente la presencia de los azucares de la reacción.

Como condición inicial para llevar a cabo la reacción se utilizaron 10 μL de enzima. Los resultados que se pueden observar en la Figura 11 son de cuatro reacciones bajo las mismas condiciones, sin embargo, estos son completamente distintos, como lo indican visualmente sus pendientes.

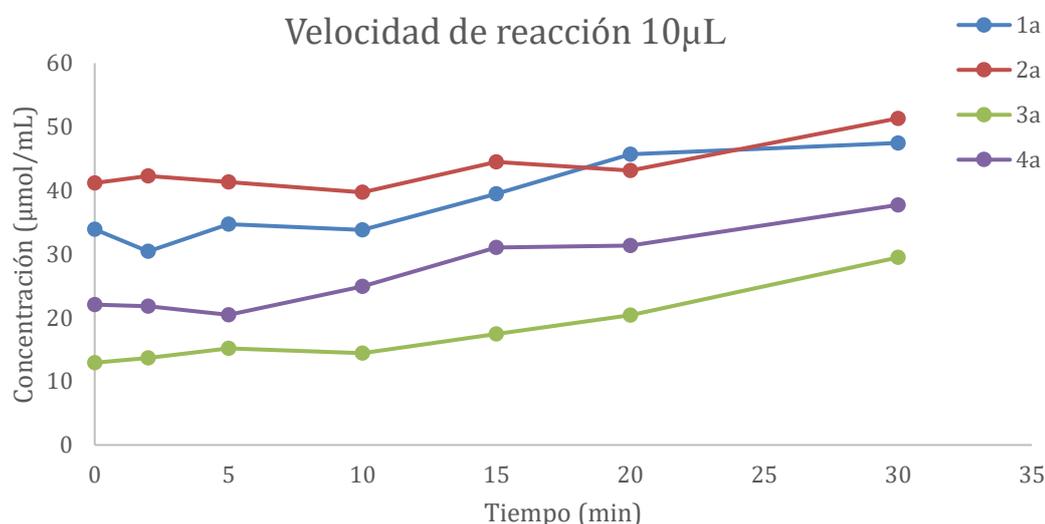


Figura 11. Concentración de azúcares reductores durante la reacción de hidrólisis de la sacarosa a 50°C, pH 5, 120 rpm, 30 min.

Se percibe fácilmente como los cursos temporales de la reacción tienden a ser constantes, es decir, que la enzima se pudiera encontrar ya en velocidad máxima. Siendo una de las incógnitas la variabilidad de los resultados entre cada reacción, incluso que durante todo el tiempo y principalmente al inicio de la reacción no se pueda observar una velocidad inicial, por ello estos datos no proporcionan utilidad alguna, pero sugieren algunas cosas.

1. Bajo las condiciones que se maneja la reacción se deberían observar pendientes iguales a pesar de la diferencia en las concentraciones a los mismos intervalos de tiempo.
2. Calculando la pendiente de las reacciones ("velocidad de reacción") los valores que se tienen son de $4 \times 10^{-4} - 6 \times 10^{-4} \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mL}$, no tiene diferencia significativa. Probablemente debido a que la enzima se encuentra en exceso.
3. Con los valores de velocidad de reacción que se tienen se observa que a pesar de tener desplazamientos la velocidad de reacción parece ser la

misma. Esto no indica que los resultados sean útiles, puesto que se debe esperar que al tiempo 0 min. se tengan valores de concentración cercanos a 0 $\mu\text{mol/mL}$.

4. El desfase entre cada inicio y termino de reacción indica que la velocidad de reacción avanza desde la toma de muestra hasta la congelación, unido a esto al descongelar a temperatura ambiente esta reacción seguramente avanza, influyendo también en dicha variación.

Para corroborar esto se cambió el método de congelación por uno donde esta se congela casi de manera inmediata, con CO_2 sólido y acetona para no permitir a la enzima seguir con dicha reacción, aunado a esto se redujo la concentración de la enzima para también ayudar a que la cinética sea la adecuada para tener un análisis (velocidades iniciales de reacción) añadiendo 5 μL de enzima. Teniendo nuevamente la concentración de azúcares reductores en función del tiempo, para obtener un gráfico del mismo tipo que el anterior (Figura 12).

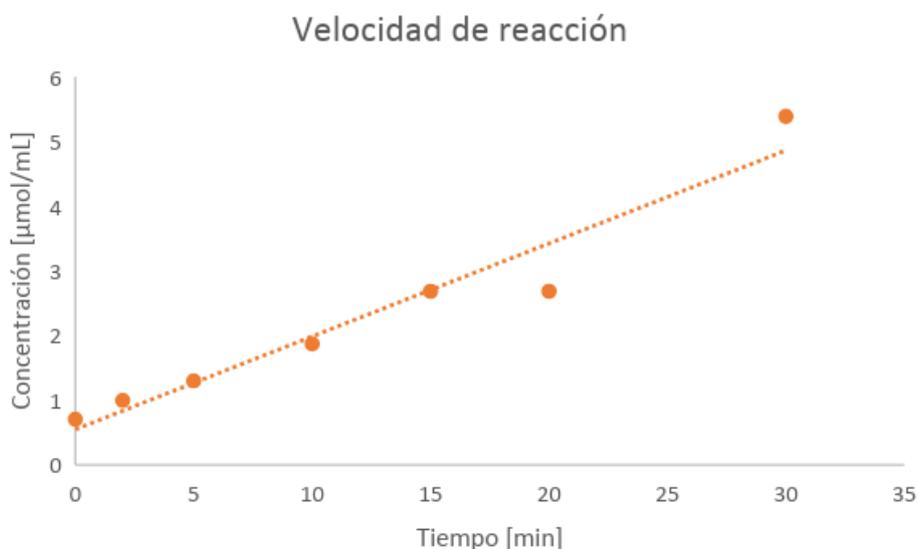


Figura 12. Concentración de azúcares reductores durante la reacción de hidrólisis de la sacarosa a 50°C , pH 5, 120 rpm, 30 min.

En la figura 12 se observa un aumento en la concentración de azúcares reductores de manera proporcional con el aumento de tiempo, como es de esperarse. Al tiempo 0 min. tiene un valor de azúcares reductores de 0.70 $\mu\text{mol/mL}$, esto es lo más adecuado para la concentración al inicio de la reacción puesto que esto es un valor ya muy cercano a 0. Con la disminución de la cantidad de enzima y un método de congelación más eficiente permite un mejor

control de la cinética de la reacción. Para corroborar los productos de reacción se hizo un análisis cualitativo por una cromatografía de capa fina (TLC) con una fase móvil que permite una separación en la cual podemos observar los azúcares debido a su polaridad y por el peso molecular (de menor a mayor). La Figura 12 muestra la TLC de la reacción, usando como testigos control a la sacarosa, así como los productos de reacción a los 2, 15 y 30 min., con ello se pretende ir siguiendo el avance de reacción.

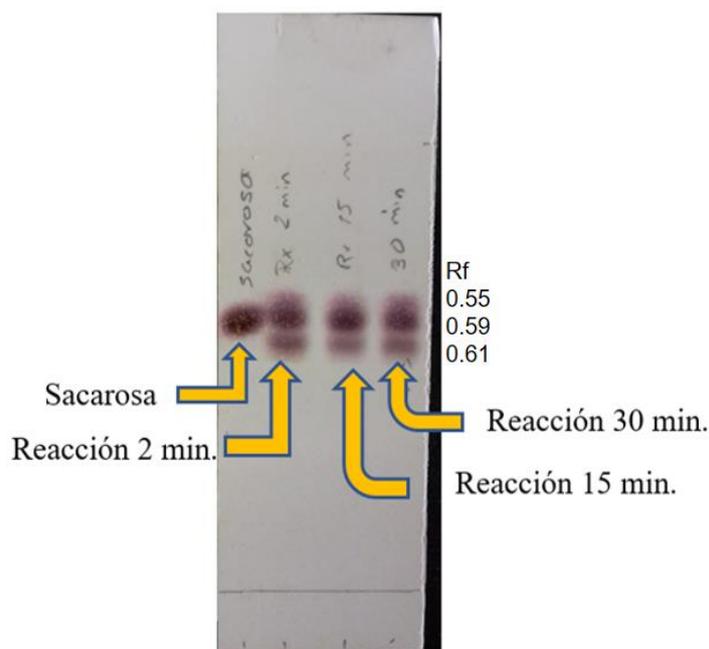


Figura 13. TLC a diferentes tiempos de la reacción. Fase móvil butanol:metanol:agua:ac. acético (3:3:1:0.2)

En la Figura 13 se tiene 4 puntos de aplicación, los cuales donde fueron colocados se definirán como “carriles”, estos carriles de los diferentes tiempos sugieren a tres compuestos distintos puesto que corrieron a lo largo de la placa de manera distinta, por ello se determinaron los tiempos de retención o más conocido como el valor Rf, el cual es un valor único para cada compuesto a las mismas condiciones cromatográficas en la misma placa. El mismo Rf para la sacarosa es de 0.59, la misma que se observa como la intensidad del punto a ese Rf con el tiempo disminuye, es decir, la concentración va disminuyendo con

el avance del tiempo esto debido a la hidrólisis realizada por la enzima que va transformando el sustrato de reacción, en glucosa y fructosa.

A partir de ello se observan dos nuevas señales diferentes a la del testigo de sacarosa, estas dos con valores de Rf de 0.55 y 0.61, lo cual indica compuestos de menor y mayor peso molecular respectivamente. Esto se corrobora con otra cromatografía, donde se colocaron diferentes azúcares y la reacción a los 30 min. puesto que es donde se observa una mayor concentración de los compuestos que se están formando, asumiendo que el de menor peso molecular es producto de la hidrólisis (glucosa y fructosa monosacáridos que forman la sacarosa) y el de mayor es derivado de una transfructosilación (asumiendo esto se trataría de una 1 o 6 kestosa).

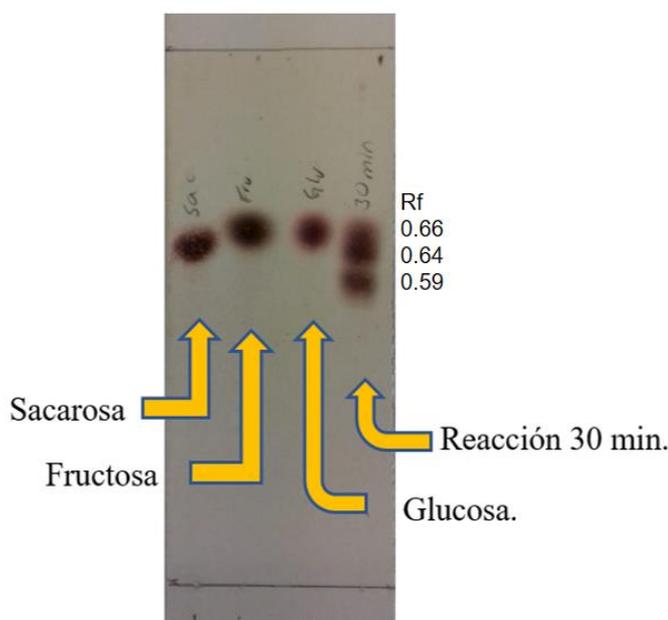


Figura 14. TLC con controles sacarosa fructosa y glucosa. Fase móvil butanol:metanol:agua (3:3:1:0.2)

En la Figura 14 presenta como testigos sacarosa, fructosa y glucosa para observar en la reacción un comportamiento idéntico de tiempo de retención a estos testigos. Claramente el carril donde fue aplicada el punto de la reacción a los 30 min, se encuentran tres puntos diferentes. Comparando con valores de Rf para la sacarosa, fructosa y glucosa que son 0.64, 0.66 y 0.66 respectivamente, con los que muestra la reacción enzimática, señalan que efectivamente se está llevando a cabo una hidrólisis puesto que un punto de los tres que se encuentran

en la reacción coinciden con el Rf (0.66) de los monosacáridos (glucosa y fructosa), el Rf de 0.64 que pertenece a la sacarosa coincide con uno de la reacción, es decir, no se consume la totalidad de sacarosa durante la reacción por ello su presencia. Si comparamos esto con lo que indica la figura 14 que a los 30 min. se tiene una concentración de azúcares reductores de 5.38 $\mu\text{mol/mL}$, valor que no supera el total de azúcar que contiene el medio de reacción (55.50 $\mu\text{mol/mL}$ esto en sacarosa). Sin embargo, también es interesante notar que se cuenta con un nuevo compuesto con un Rf inferior (0.59) al de la sacarosa (0.64), indicativo de que se está llevando a cabo la transfructosilación de la sacarosa y probablemente la señal del monosacárido que se observa sea la de la glucosa liberada durante la reacción.

Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática y producción de FOS

Gracias al análisis por TLC (Figura 14) se sabe que la reacción de transfructosilación se está llevando a cabo. Como parte de la caracterización del sistema enzimático, se debe conocer la concentración de sustrato más adecuada para la síntesis de FOS. Debido a que “una enzima típica”, a medida que la concentración de sustrato aumenta, la velocidad inicial (v_i) se incrementa hasta que alcanza un valor máximo $V_{\text{máx}}$. Cuando los aumentos de la concentración de sustrato no incrementan más la v_i , se dice que la enzima está “saturada” con sustrato” (Murray R., 2013). Con esto y tomando en cuenta que la transfructosilación es una reacción que tiene lugar a través de un mecanismo de doble desplazamiento, con un donante y un receptor, jugando el papel importante la sacarosa como este grupo receptor; el sistema sacarosa-enzima va a desplazar el equilibrio hacia la formación de FOS. Al aumentar la concentración de sustrato (1,2,3,5,10,12% m/v) se podría suponer que se favorecerá la síntesis de dichos FOS, además de evaluar el efecto de la concentración sobre la actividad enzimática. Los datos que se obtengan de cuantificar por DNS permitirán calcular los parámetros cinéticos ($V_{\text{máx}}$ y K_m) del sistema enzimático.

En la figura 15 se presenta el resultado del curso temporal de la reacción (velocidades iniciales de reacción) a distintas concentraciones de sustrato,

donde se puede observar la tendencia que tienen todas las reacciones desde la menor (1% m/v) hasta la mayor (12% m/v) concentración

En la Figura 15 se observa una intersección a los 17 min de las velocidades entre el 10 y 12%, esto podría deberse a una rápida saturación de la enzima a 10% de concentración de sacarosa.

Como es de esperarse al aumentar la concentración de sustrato la enzima se satura más rápidamente, la velocidad de reacción aumenta. Con el exceso de sacarosa la síntesis de FOS no se ve perjudicada puesto que se tienen los mismos compuestos (los monómeros, sacarosa y probablemente kestosa) con ello se prueba que no se inhiben las actividades de transfructosilación y de hidrólisis. En la Figura 16 se muestra como ejemplo el TLC de la reacción a 10% m/v de sacarosa, donde se muestra durante el seguimiento de la reacción se tiene la presencia de los compuestos: combinación glucosa- fructosa, sacarosa, y probablemente kestosa y cómo van cambiando la distribución de sus concentraciones.

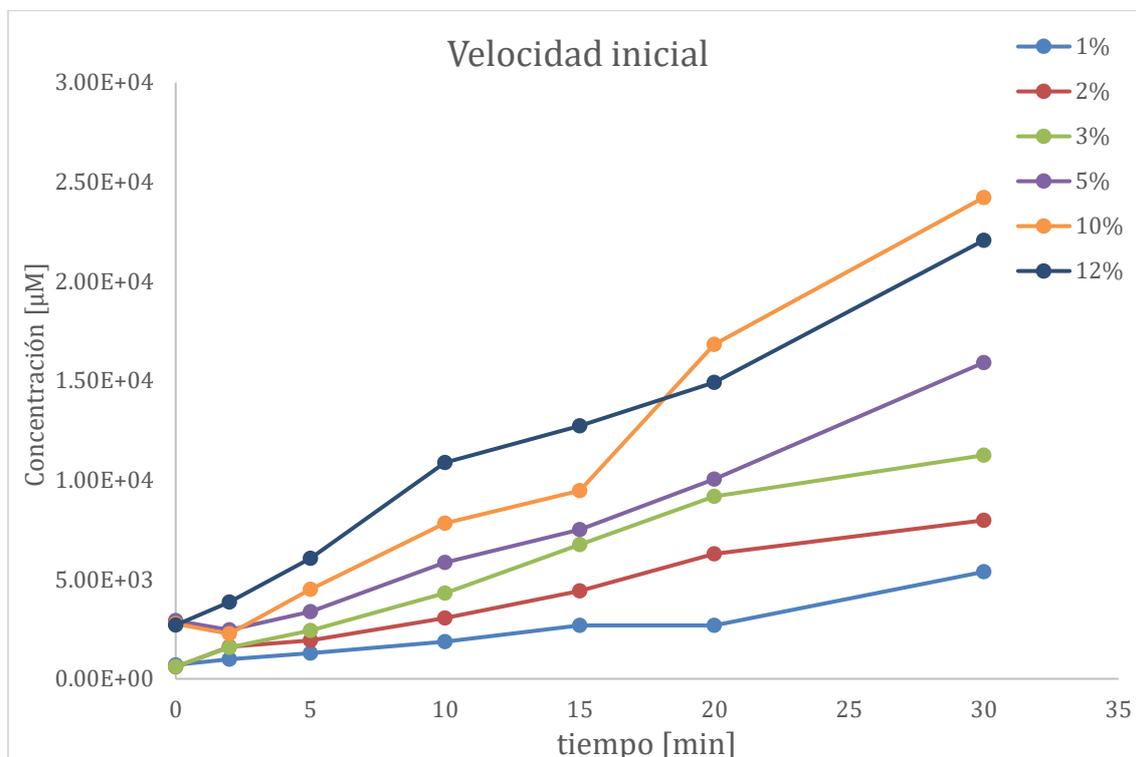


Figura 15. Comportamiento enzimático a diferentes concentraciones de sacarosa, 50°C, pH 5, 120 rpm, 30 min.

Un hecho observado en todos los TLC realizados es que la actividad de hidrólisis sigue presente (al ser observados los monosacáridos en todas ellas), así como la de transfructosilación (por la presencia de kestosa), puesto que se ha demostrado que se necesitan ambas actividades para que se forme la kestosa (Jintonnom J., 2018) promoviendo así la síntesis de FOS, con el aumento en la concentración de sacarosa.



Figura 16. Avance de reacción de la enzima con 10% sacarosa (G:glucosa, S:sacarosa, 2 15 30: tiempo en minutos, A:reacción a 24h) Fase móvil butanol:isopropanol:agua (7:5:2)

Los TLC de las reacciones mostraron la misma tendencia que conforme avanza el tiempo, la sacarosa va disminuyendo, así como la aparición de la kestosa que se está formando y la presencia de los monómeros. Por otra parte, en la misma Figura 16 se puede observar la reacción a 24 horas (A), esto con la finalidad de comprobar si a mayor tiempo podía producirse un compuesto nuevo de mayor tamaño, dando FOS de mayor peso molecular, cosa que no se observó al aumentar el tiempo, teniendo solo presentes los compuestos ya conocidos.

Una de las cosas que se observó al dejar las reacciones por 24 h es que aún hay presencia de sacarosa cuando teóricamente debería ya no existir, esto hace la suposición que el sistema enzimático deja de tener actividad en algún momento o que este sistema también hidroliza a la kestosa por ello es que no se está formando un compuesto de mayor peso molecular y esto mantiene en equilibrio a los monómeros, sacarosa y kestosa. Aún con esto se puede afirmar que la concentración de FOS es directamente proporcional a la concentración de sacarosa presente en el sistema. El número de colisiones con sacarosa favorece

que la enzima interactúe más rápidamente con el sustrato y pueda formar más FOS. (Jintonnom J., 2018)

Con los datos de velocidades iniciales obtenidos a distintas concentraciones de sustrato, estos se graficaron para observar el efecto de la concentración sobre la actividad enzimática, obteniéndose un comportamiento del tipo Michaelis-Menten Figura 17

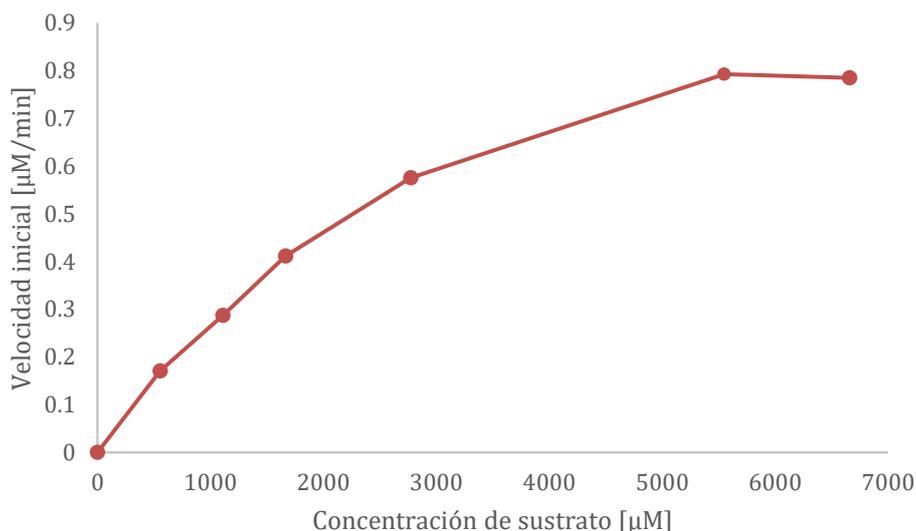


Figura 17. Ajuste a Michaelis-Menten del comportamiento enzimático de la mezcla de Novozym 960

Con el modelo de Michaelis-Menten se obtienen los términos matemáticos que relacionan la velocidad inicial y la concentración de sustrato. Se utiliza la ecuación de Michaelis-Menten con el método gráfico para poder llevarlo a la extrapolación de los parámetros cinéticos que describen al sistema enzimático. Este arreglo matemático es propuesto por Lineweaver-Burk (Belitz, *et al.*, 2011) como se muestra a continuación.

La ecuación de Michaelis-Menten

$$v_i = \frac{V_{max}[S]}{k_m + [S]}$$

Se invierte

$$\frac{1}{v_i} = \frac{k_m + [S]}{V_{max}[S]}$$

Se factoriza

$$\frac{1}{v_i} = \frac{k_m}{V_{max}[S]} + \frac{[S]}{V_{max}[S]}$$

Y se simplifica

$$\frac{1}{v_i} = \left(\frac{k_m}{V_{max}}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Con esto se tiene un arreglo como ecuación de la línea recta $y=mx+b$ donde la pendiente es k_m/V_{max} y la ordenada al origen $1/V_{max}$ ahora se hace un gráfico (Figura 18) con la función $1/[s]$ que se conoce como del doble recíproco o de Lineweaver-Burk (Murray R., 2013).

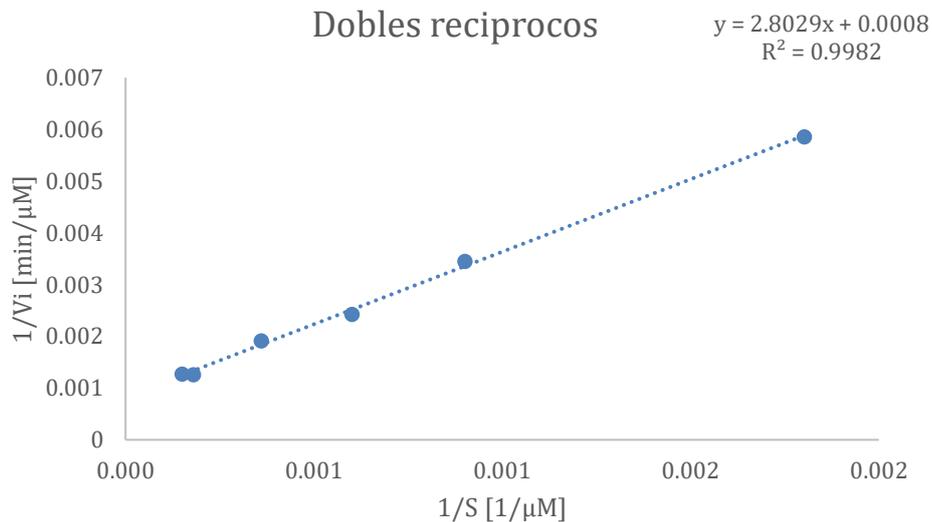


Figura 18. Método Gráfico de dobles recíprocos para el cálculo de K_m y V_{max} del sistema enzimático

Debido a que el sistema enzimático es una mezcla de endo y exoinulinasas y los modelos con Michaelis-Menten consideran una concentración de enzima pura en particular solo se puede hacer un estimado de parámetros cinéticos “aparentes” (Tabla 5) con ayuda del Figura 16. Con esto se sabe que concentraciones por superiores al 6% m/v están por arriba de la K_m .

Tabla 5. Ajuste lineal de Lineweaver-Burk

V max [mM/min]	Km [mM]
6.35 E-04	3.60
127.50	37.19

La tabla 5 muestra en **negritas** los resultados obtenidos experimentalmente de Novo 960 mientras que los otros valores son los obtenidos por Li Xu y su grupo de trabajo (Xu, *et al.*, 2014) los cuales están muy por encima de los que se obtienen con Novo 960, esto se atribuye a que la mezcla de enzimas no se encuentra purificada, por ello tienen una mejor actividad respecto a una enzima pura como la del grupo de Xu.

Para trabajar en adelante seleccionó la concentración de 10% m/v para favorecer que la concentración del sustrato se encuentra por arriba de la Km de la enzima y favorecer que la enzima se encuentre saturada, aunque a cualquier concentración se producen FOS es mejor que se produzcan en mayor proporción más rápidamente. Para corroborar todo lo anterior se realizó un análisis por HPLC de la reacción 10% m/v de sacarosa (figura 19).

Se usan controles de oligosacáridos de glucosa para identificar el tiempo de retención al que saldrían los compuestos de la reacción se utilizaron controles de para establecer los tiempos de retención: 7.36 min fructosa, 10.015 min glucosa, 11.86 min sacarosa, 29.42 min trisacárido y 50.21 min tetrasacárido (estos datos no son mostrados como figuras, puesto que los tiempos que se obtienen de la experimentación son diferentes).

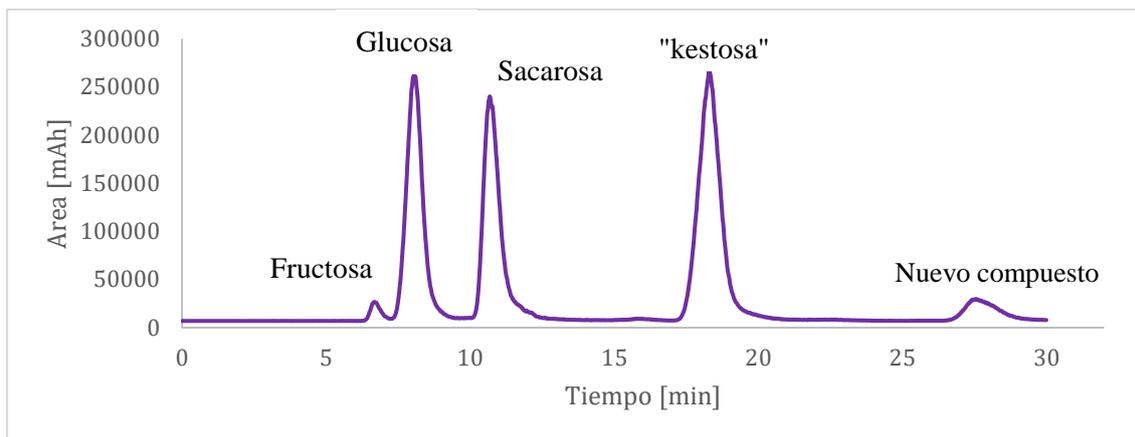


Figura 19. Cromatograma obtenido de la reacción 10% Sacarosa (m/v)

Lo observado en la Figura 19 varía mucho de los resultados de los controles, puesto que los controles de oligosacáridos son de glucosa.

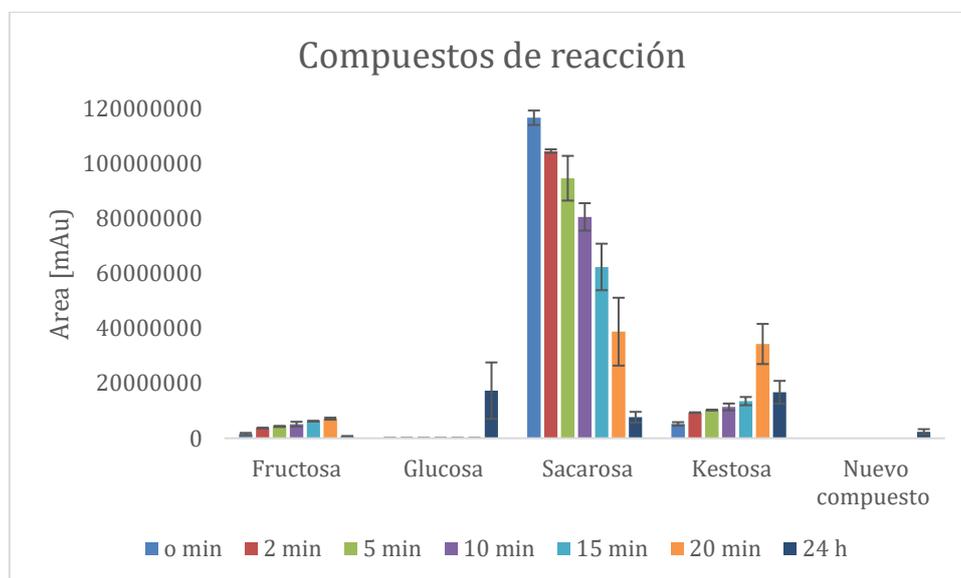


Figura 20. Compuestos detectados por HPLC de la reacción 10% m/v sacarosa, 50°C, pH 5, 120 rpm.

Esta figura (20) no se muestra la glucosa desde el tiempo 0-20 min. debido a que la concentración de sacarosa es mucho mayor debido a que se está trabajando en el medio abundante en sacarosa, al estar los tiempos de retención de la glucosa y la sacarosa cercanos ocurre un fenómeno de apantallamiento por parte de la sacarosa que no permite determinar a la glucosa. El análisis por HPLC mostró resultados de tiempos de retención un tanto diferentes a los esperados, un ejemplo es el del trisacárido que estamos asumiendo formado ya que el control muestra un tiempo de 29.42 y el trisacárido detectado tiene tiempos de

17-17.8 min. es una diferencia bastante marcada entre los tiempos de retención. Sin embargo, es necesario considerar que estos podrían moverse ya que se está comparando con trómeros de glucosa, mientras que la kestosa obtenida tiene 2 moléculas de fructosa y una de glucosa. Además, con el comportamiento que se observa en la fructosa en la figura 17 y los datos DNS dan el indicativo que la fructosa está disminuyendo en concentración con el avance del tiempo aún con la hidrólisis llevándose a cabo.

Asumiendo que un trisacárido que use fructosa en su estructura tendría un peso molecular menor que el de un trisacárido formado de solo glucosas, es por esto por lo que el tiempo de retención en la columna del compuesto es menor al del control que se utiliza (Jintonnom J., 2018)

Ahora observando nuevamente la figura 20 se tiene de manera muy clara el desplazamiento de los compuestos al transcurrir del tiempo. Lo cual confirma que se están sintetizando FOS a partir de sacarosa y usando a la fructosa como grupo donante (Jintonnom J., 2018), porque al avanzar del tiempo el área de la sacarosa va disminuyendo y va aumentando la del tipo kestosa, puesto que las áreas mostradas por muestra en el HPLC están relacionadas con la concentración. Se puede decir que los equilibrios simultáneos forman un compuesto del tipo kestosa (por utilizar a la fructosa para unirse a la sacarosa) en cuanto la enzima tiene contacto con el medio se lleva a cabo la formación de los compuestos (Jintonnom J., 2018).

Ahora un fenómeno interesante de este análisis es que a las 24 horas se tiene un compuesto de un peso molecular aun mayor comparado con la kestosa con un tiempo de retención de 27.5 min y un área de aproximada de 3.1×10^6 mAh lo cual no es tan despreciable y es el indicativo de que el tiempo y las concentraciones de compuestos juegan un papel fundamental en la transfructosilación con sacarosa.

Actividad de transfructosilación con la adición de Glucosa y Fructosa.

Para corroborar que la sacarosa es un intermediario fundamental para lograr la transfructosilación y así la formación de FOS se planteó modificar el sustrato

inicial, con los intermediarios de la reacción que son la sacarosa, fructosa y glucosa con la combinación planteada en la Tabla 4.

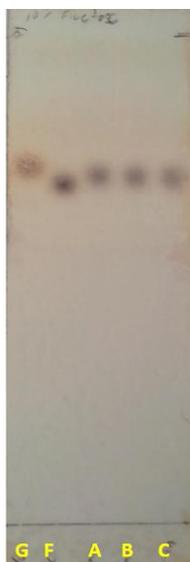


Figura 21. Reacción de fructosa como sustrato (G:glucosa, F:fructosa, A:2 min, B:15 min, C:30 min) Fase móvil butanol:metanol:agua:ac. acético (3:3:1:0.2)

La Figura 21 muestra el resultado de la reacción de Fructosa al 10% m/v, lo que sería una reacción fructosa-fructosa, como se observa no se tienen productos u otro tipo de compuestos diferentes a los monosacáridos, por esto se supone que no existe reacción de ningún tipo, como es de esperarse. Adicionar como azúcar único a la fructosa no presenta la formación de un polímero o de algún compuesto de un mayor peso molecular puesto que la enzima tiene un mecanismo de hidrólisis. Un exceso de sacarosa es lo que provoca un fenómeno de doble desplazamiento que lleva al mecanismo de transfructosilación (Jintonnom J., 2018). Es decir, que se necesita que la enzima este hidrolizando para poder llevar acabo la transfructosilación y comenzar a presentar la formación de FOS (Jintonnom J., 2018). De manera cuantitativa el análisis por DNS no muestra concentración alguna de azúcares que son monosacáridos (fructosa o glucosa) y FOS (“kestosa”) propiamente.

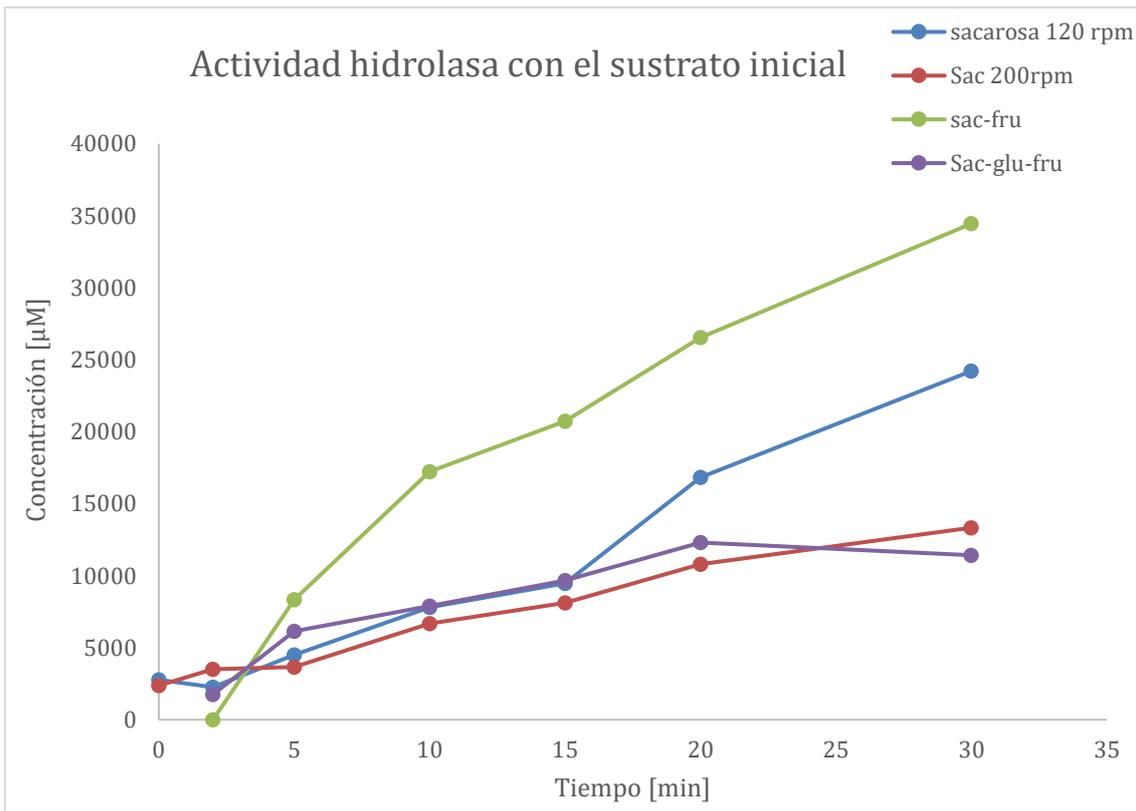


Figura 22. Efecto sustratos en la actividad enzimática aparente. Sacarosa 10%, Glucosa 1%, Fructosa 1%, (%m/v) a 50°C, pH 5, 30 min.



Figura 23. Reacción de sacarosa-fructosa (F: Fructosa, S: Sacarosa, A: 2 min, B: 15 min, C: 30 min, D: 120 min, E: 360 min) Fase móvil butanol: metanol: agua acético (3:3:1:0.2)

Las figuras 22 y 23 muestra igualmente que el avance del tiempo favorece la síntesis de FOS (kestosa) la figura muestra a glucosa-fructosa-sacarosa como sustrato, siendo un ejemplo de lo que ocurre con las demás reacciones donde

está implicada la sacarosa, nuevamente muestra resultados que son indicativos que la presencia de la sacarosa para formar FOS. Por otro lado, la figura 22 presenta como está relacionado y que es necesaria la presencia de un grupo donador (fructosa) y un aceptor (sacarosa) para la formación de la kestosa (Jintonnom J., 2018).

Ahora bien, en la figura 22 presenta un cambio interesante respecto a las otras reacciones, un incremento en la actividad aparente de las enzimas muestra un nivel mayor de azúcares reductores, puesto que los resultados mostrados en la figura son eliminados el control de reacción que contiene los sustratos sin la enzima, con esto los resultados se puede suponer lo siguiente:

1. La adición de fructosa promueve la hidrólisis de la sacarosa, así libera más azúcares reductores al medio que promueve a su vez la formación de FOS.
2. La presencia de la fructosa induce al medio a la transfructosilación y así forma FOS que son cuantificados como azucares reductores siendo así determinados por DNS.

Ambas propuestas justificarían el aumento en la velocidad de reacción por la presencia de azúcares reductores, para saber cuál de las dos se está llevando a cabo es necesario un análisis más especializado como lo es HPLC, si se observa un aumento en la concentración de FOS, así como la disminución de sacarosa y fructosa juntos indica la síntesis de FOS. Si se observa disminución de sacarosa y aumento de monosacáridos sería que la hidrolisis se está favoreciendo.

Efecto del inmovilizado en la producción de FOS

Hacer rentable la producción a niveles piloto e incluso industriales es parte de la biotecnología como técnica, utilizado en producción con enzimas los inmovilizados muestran su potencial por el uso de la misma enzima en varios procesos, por ello se llevó a cabo la inmovilización de la enzima en una matriz de PVA- PEG como se muestra en la Figura 23.



Figura 23. Inmovilizado de Novo 960 en una matriz de PEG-PVA.

- *Sistema enzimático en inmovilizado para la producción de FOS*

El inmovilizado en PVA-PEG demostró tener propiedades de elongación, plásticas y elásticas en un trabajo previo (Frías N., et al 2018). Lo cual es un excelente material para síntesis en medio acuoso además de la superficie de contacto que se tiene por su forma física esférica el PVA-PEG debe tener una buena difusión.

El problema es en cuestión cómo Novo 960 verá influenciada su actividad de transfructosilación, algo que primero es un problema es la cantidad de enzima atrapada, teóricamente por un balance de masa se obtiene el resultado aproximado para cada perla de 5.12 μg .

Para probar la efectividad del inmovilizado primero se probó colocar las perlas necesarias (dos) para igualar aproximadamente la cantidad de enzima que se usa sin inmovilizar que se define como “enzima libre”, sin embargo, después de los primeros 30 min. no existe reacción alguna, tanto DNS como TLC (Figura 24), muestran resultados que solo corroboran que solo existe sacarosa. Aún con el aumento a 5 perlas no se favoreció en gran medida los azúcares reductores, después de los 30 min. de reacción solo se tienen 0.17 mg en azúcares reductores. Esto no es aún de utilidad para hacer del inmovilizado como técnica para la síntesis de FOS.



Figura 24. Avance de reacción del inmovilizado PVA-PEG con 10% sacarosa (G:glucosa, S:sacarosa, 2 15 30: tiempo en minutos, Fase móvil butanol:metanol:agua:ac. acético (3:3:1:0.2)

Los resultados anteriores respaldan que el inmovilizado enzimático afecta la actividad enzimática, reduciéndola. Con ello la cantidad de enzima adicionada es de 51.2-53.5 μg de proteína por cada medio de reacción esto es un aproximado de 5.5 veces más cantidad de enzima en el inmovilizado que de manera libre. Se están adicionando 1.8 μg de proteína/mL.

Con esta cantidad de enzima inmovilizada se tiene resultados que son apreciables para la formación de azúcares reductores los cuales ya incluyen a los FOS, la Figura 25 muestra el resultado de dicha reacción, en esta se puede apreciar cómo se está favoreciendo la síntesis de FOS y existen una presencia baja de monómeros, con eso estamos limitando la actividad hidrolítica y favorecemos la actividad de transfructosilación, entonces la actividad medida por azúcares reductores (DNS) que se está obteniendo se asume que es para la formación de FOS que también tienen un azúcar reductor. Los FOS tienen un poder reductor menor a la glucosa y la fructosa, por esta razón también se puede asumir que como está sintetizándose la “kestosa” la cantidad que estamos cuantificando pareciera ser menor, es decir, que se está haciendo cuantificando moléculas (glucosa, fructosa al ser la 1-kestosa de mayor tamaño por necesitar 3 moléculas estamos estimando 3 veces menos azúcares reductores.



Figura 25. Avance de reacción del inmovilizado PVA-PEG con 10% sacarosa (G:glucosa, S:sacarosa, 2 15 30: tiempo en minutos, Fase móvil butanol:isopropanol:agua (7:5:2)

Aunque con dicho criterio TLC no muestra una concentración muy amplia, incluso la concentración de sacarosa sigue siendo demasiada alta.

- *Ciclos de utilidad del inmovilizado PEG-PVA*

Parte de hacer rentable el proceso y como parte fundamental es la recuperación de la enzima, los ciclos de utilidad para las enzimas inmovilizadas, es cuantas veces se puede utilizar una enzima para seguir produciendo. En este sentido se usó más enzima 2.1 µg de proteína/mL en el medio de reacción así se presentan los resultados en la Figura 26

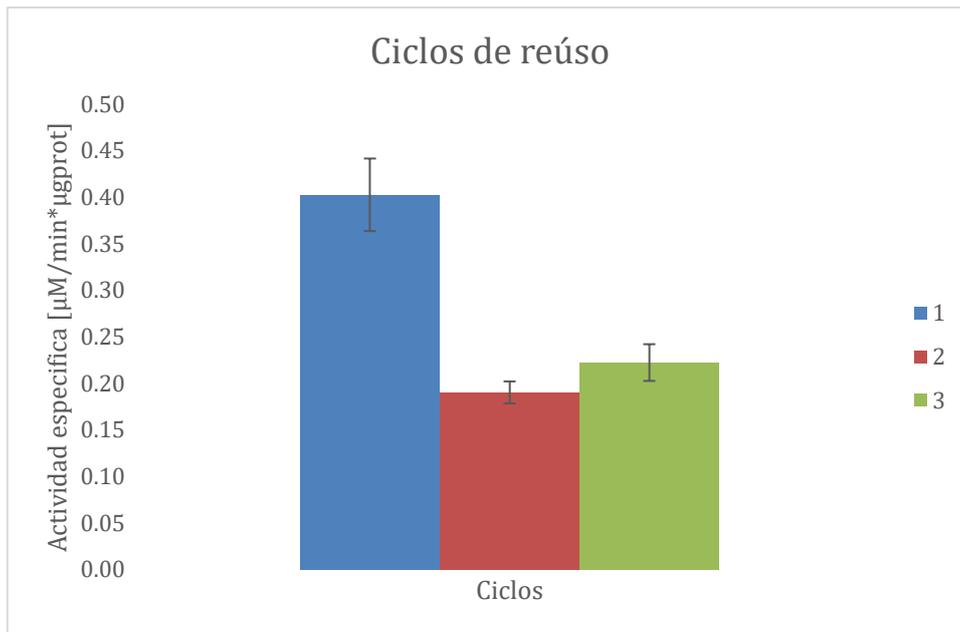


Figura 26. Actividad enzimática en durante tres ciclos de reusó. Por la concentración de azúcares reductores durante la reacción de hidrólisis de la sacarosa a 50°C, pH 5, 120 rpm, 30 min.

La Figura 26 muestra cómo se la actividad baja drásticamente del primer a segundo ciclo se pierde un 52.7% de actividad y se mantiene la actividad hasta un tercer ciclo, lo que es un fenómeno característico de los inmovilizados de este tipo, puesto que se genera un desgaste, que se ve reflejado en rendimientos, que a su vez baja la actividad. De principio esto lleva a pensar que está sucediendo en la reacción y porque existe esa pérdida de actividad con ello se tienen las siguientes observaciones:

1. Que pueden quedar FOS dentro de la matriz que es el inmovilizado puesto que, al sintetizar compuestos de mayor tamaño, puede existir un problema de transporte o difusión para salir del copolímero PVA-PEG.
2. Se llega a tener una interacción por puentes de hidrógeno entre los azúcares que están libres en el medio con la esfera de PEG-PVA, formando una pequeña película que impida la entrada y salida de los compuestos.
3. El fenómeno de hinchamiento de las esferas, propiciado por la presencia del PVA, conduce a que las moléculas de agua estén impidiendo el acceso al sitio activo.
4. La enzima se está desprendiendo de la matriz de PVA-PEG.

5. La actividad que las enzimas conservan no es útil para hacer la síntesis de FOS, puesto que el agua podría interferir en las interacciones de la proteína con la matriz que sirve para el atrapamiento, o el sitio activo de la enzima no está disponible para catalizar la reacción.

Para corroborar que el fenómeno del cambio drástico de la actividad no fue único, se reprodujo la reacción, pero ahora un aumento el número de ciclos para ver un efecto prolongando el uso del inmovilizado. Así como el análisis de los lavados entre cada ciclo por DNS y cuantificación de la proteína en las esferas de inmovilizado para observar si es que se desprendía algo de esta. Los lavados ayudan a retirar los azúcares de las esferas, rompiendo interacciones inmovilizado azúcares, dejando así el inmovilizado prácticamente sin rastros de compuestos

Lo anterior mencionado se muestra en el siguiente grafico (Figura 27):

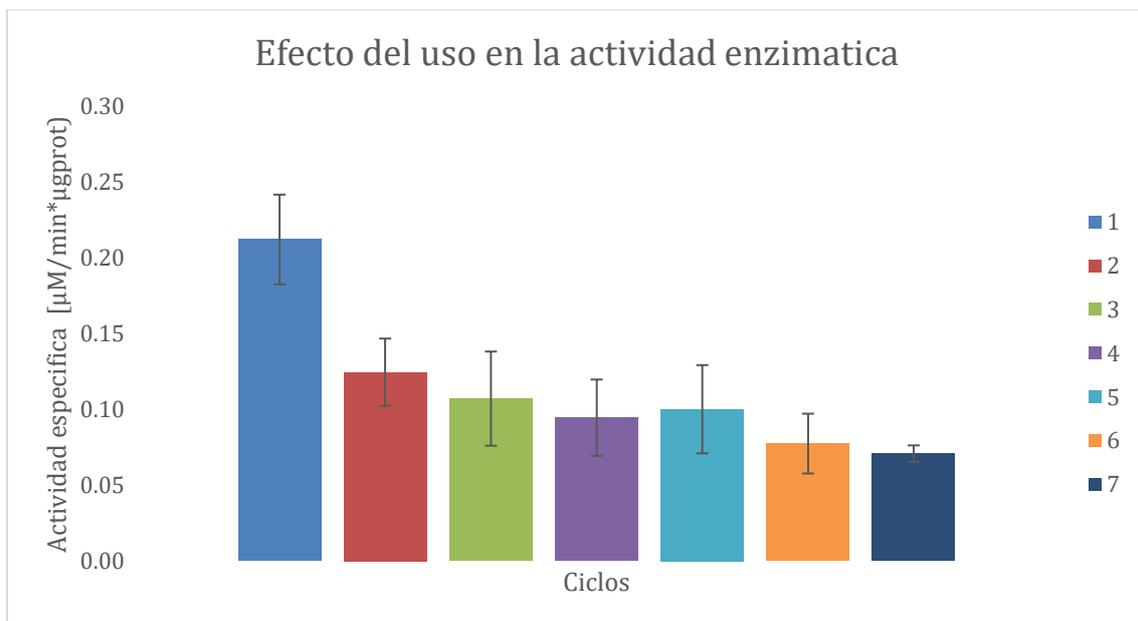


Figura 27. Actividad enzimática en cada ciclo de reusó. Mediante la concentración de azúcares reductores durante la reacción de hidrólisis de la sacarosa a 50°C, pH 5, 120 rpm, 30 min.

En este caso se observa que se pierde la actividad en un 41.3% entre el primer y segundo ciclo, posterior a este segundo ciclo la actividad no tiene un gran efecto de pérdida hasta el séptimo ciclo. La figura 28 muestra los azúcares que quedan en las perlas después de la reacción, con este se comprueba el efecto

de crecimiento en la actividad del ciclo 5 puesto que al terminar este ciclo el lavado muestra muchos azúcares adheridos a esta.

Otro efecto que se esperaba observar es que la enzima se estuviera desprendiendo del inmovilizado, pero el análisis de proteína muestra que no hay pérdida de la enzima.

Como se dijo antes el inmovilizado pareciera tener la tendencia a favorecer la transfructosilación vs la hidrólisis, pero esto es desmentido por el TLC de los ciclos del inmovilizado (Figura 29) el seguimiento de reacción entre los ciclos permite observar que al pasar al ciclo 3, la producción de FOS es muy tenue, al ver el punto de aplicación del ciclo 5 y 7 el TLC ya no muestra rastro alguno de un compuesto fuera de la sacarosa. Al estar presentes en el análisis por DNS (Figura 28) azúcares reductores quiere decir que la enzima sigue teniendo actividad, está ya no es representativa y mucho menos útil para una síntesis de FOS, por ello para este inmovilizado usarlo hasta un 3er ciclo sería lo más sensato.

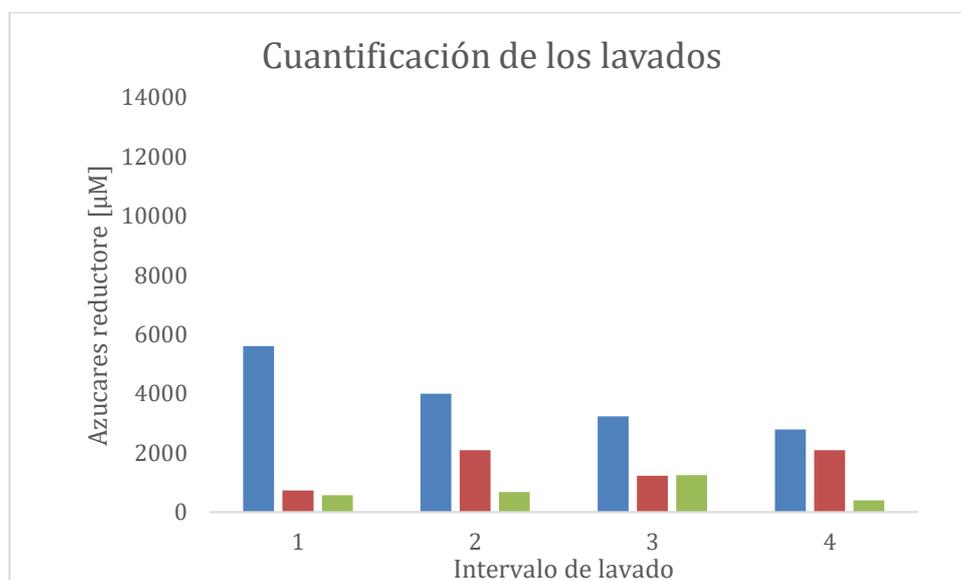


Figura 28. Azúcares reductores presentes en las esferas antes del siguiente ciclo de reacción. Son tres lavados por intervalo del ciclo, usando Fructosa como referencia. Quitó el ciclo 5 y 6



Figura 29. Representación de los ciclos de reusó para el inmovilizado PVA-PEG(G:glucosa, S:sacarosa, I III V VII: primer,tercer,quinto y séptimo ciclo, Fase móvil butanol:isopropanol:agua (7:5:2)

Conclusiones.

Para llevar a cabo la posible síntesis de una “kestosa” se requiere de manera significativa la sacarosa, ya sea que la fructosa provenga de la hidrólisis o adición de ésta se van a formar FOS.

Concentraciones superiores al 10% m/v de sacarosa favorecen la producción de FOS y la adición de fructosa también.

Un inmovilizado por atrapamiento en un copolímero de PEG-PVA, no es de utilidad y mucho menos rentable para la síntesis de FOS, debido a la baja concentración de FOS con una pérdida de actividad mayor al 50% con una concentración de enzima mayor al doble que la enzima “libre”.

Perspectivas.

- Determinar cuantitativamente la proporción de la actividad de transfructosilación respecto a la hidrolasa.
- Separar y purificar la mezcla Novo 960 para obtener la endo y exo inulinasas.
- Determinar si las enzimas endo y exo son necesarias para llevar a cabo la transfructosilación.
- Utilizar un nuevo método de inmovilizado como el encapsulamiento en gel

Referencias.

1. *Glosario de términos definidos por la FAO*. Recuperado 14-septiembre-2017 desde: <http://www.fao.org/docrep/014/am401s/am401s07.pdf>
2. H.-D. Belitz., Grosch W., Schieberle P., (2009), *Química de los alimentos*, Zaragoza, España, Acribia, S.A. pp 217-238, 259-265.
3. Mc Murry J., (2008), *Química Orgánica*, Ciudad de México, México, CENGAGE Learning, pp. 686-694.
4. Singh, SP, Jadaun, JS, Narnoliya, LK y col. *Appl Biochem Biotechnol* (2017) 183: 613
5. Department of Food Science and Agricultural Chemistry Macdonald Campus, McGill University Quebec, Canada (2013). *Enzymatic Synthesis of Fructooligosaccharides and Levan*.
6. Feng Tian, Lotthida I y Salwa K. (2011). *Purification and Characterization of Levansucrases*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75 (10), 1929-1938.
7. Yun J.W., Kim D.H., Uhm T.B. and Song S.K. (1997), *Production of high-content inulo-oligosaccharides from inulin by a purified endoinulinase*. *Biotechnology Letters*, Vol 19, No 9, pp 935-938.
8. *Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos*. Recuperado 14-septiembre-2017 desde: <http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-spanish-2011.pdf>
9. Mario Gustavo López Gómez (2012). *Producción enzimática de fructooligosacáridos*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química (UNAM). Recuperado 20-septiembre-2017
10. Cristina R.M., Carlos L. y Antonio N.I, (2012) Producción de fructooligosacaridos por invertasa de *Aspergillus niger* IB56: *Un prebiótico de importancia para la salud humana y animal*, *Boletín Micológico*, Vol 27, pp. 18-23. Recuperado 25-septiembre-2017 desde <file:///C:/Users/User/Downloads/891-2327-1-PB.pdf>
11. Joaquin M (1994), *Elección de un reactor a nivel laboratorio para la inmovilización de la enzima invertasa, donde se lleve a cabo un proceso de hidrólisis continua de sacarosa en fructosa y glucosa* (tesis de

- licenciatura). Facultad de Estudios Superiores Cuatitlán.. Recuperado 15-noviembre-2017
12. Gerardo P. (2016), *Producción y caracterización de una exo-unilunasa procedente de Bacillus amyloliquefaciens con actividad sobre fructanos de Agave tequilana Weber variedad azul (agavinas)*. (Tesis de licenciatura). Facultad de Química (UNAM).
 13. Sungsoo C. S., Prosky L., y Dreher M.,(2005), *Complex Carbohydrates in food*. New York: Marecel Dekker INC., 199, pp 190
 14. Biedrzycka E., Bielecka M., (2004), *Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization*, Trends in Food Science & Technology, Volume 15, Issues 3–4, pp 170-175.
 15. Chacón-Villalobos A., (2006) *Perspectivas agroindustriales actuales de los Oligofructosacáridos (FOS)*, Agronomía Mesoamericana 17(2):265-286.
 16. R.a.p Nagem, A.L., Rojas, A.M., Golubev, O.S.; Komeeva, E.V. Eneyskaya, A.A., Kulminskaya, K.N. Neustroev, I., Polikarpov, (2004) *Crystal Structure of Exo-inulinase from Aspergillus awamori: The Enzyme Fold and Structural Determinants of Substrate Recognition*, Journal of Molecular Biology, Volume 344, 471-480.
 17. Pouyez J., Mayard A., Vandamme A-M., Roussel G., Perpète E. A., Wouter J., Housen I., & Michaux C., (2012), *First crystal structure of an endo-inulinase, INU2, from Aspergillus ficuum: Discovery of an extra-pocket in the catalytic domain responsible for its endo-activity*, Biochimie Volume 94, Issue 11., Pages 2423-2430
 18. Bonifaz J. A., (2010) *Micología Médica Básica*, Ciudad de México, México, Mc Graw Hill, pp 10-33, 381.
 19. Murray, R., K., Bender, D., A., Botham, K., M., Kennelly P., J., Rodwell, V., W., y Weil, P., A.,(2013) *Carbohidratos importantes desde el punto de vista fisiológico*, Escrito por Bender, D., A., y Mayes, P., A., Harper Bioquímica Ilustrada (pp. 132-136), Mexico, McGraw-Hill.
 20. Antosova, M., & Polakovic, M.,(2002). *Fructosyltransferases: the enzymes catalyzing production of fructooligosaccharides*. Chemical papers-slovak Academy of Sciences, 55(6), 350-358.

21. Linde, D., Rodríguez-Colinas, b., Estévez, M., Poveda, A., Plou, F.J., & Lobato, M. F., (2012) Analysis of neofructooligosaccharides production mediante by the extracelular β -fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Bioresource Technology*, 109, 123-130.
22. Jitonnoma J., R.Ketudat-Cairnsbc J., Hannongbuad S., (2018)., QM/MM modeling of the hydrolysis and transfructosylation reactions of fructosyltransferase from *Aspergillus japonicas*, an enzyme that produces prebiotic fructooligosaccharide, Volume 79, January 2018, Pages 175-184.
23. Arroyo M., (1998)., *Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones*, *Ars Pharmaceutica*, 39:2; 23-39, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Complutense de Madrid 28040 Madrid
24. Xu, L., Wang, D., Lu, L., Liu, J., Deyonhg, C., Guo, Z., Xiao, M., (2014), Purification, Cloning, Characterization, and N-Glycosylation Analysis of a Novel β -Fructosidase from *Aspergillus oryzae* FS4 Synthesizing Levan- and Neolevan-Type Fructooligosaccharides, 9(12): e114793.
25. Fernandez, R. C., Ottoni, C. A., Da Silva, E. S., Matsubara, R.M.S., Carter, J.M., Magossi, L.R., Wada, M.A.A, de Andrade Rodrigues, M.F., Maresma, B.G., Maiorano, A.E., (2007). Screening of β -fructofuranosidase-producing microorganisms and effect of pH and temperatura on enzymatic rate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(1), 87-93.
26. Murray, R., K., Bender, D., A., Botham, K., M., Kennelly P., J., Rodwell, V., W., y Weil, P., A., (2013) *Enzimas: cinética*, Escrito por Peter J. Kennelly, PhD y Victor W. Rodwell, PhD., *Harper Bioquímica Ilustrada* (pp. 70-82), Mexico, McGraw-Hill.
27. Frías Ierán. N. M, (2018), *Purificación e inmovilización de la endoinulinasa (NOVO 960) por atrapamiento en geles de PVA-PEG*, (Tesis de licenciatura), Facultad de Química, UNAM.

