



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**PRODUCCIÓN DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS (FOS) CATALIZADA POR LA  
EXOINULINASA DE *Kluyveromyces marxianus* AZ8**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestra en Ciencias**

**PRESENTA:  
Gabriela Lira León**

**TUTOR PRINCIPAL  
Dra. Carmina Montiel Pacheco  
Facultad de Química, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dr. Edmundo Castillo Rosales  
Instituto de Biotecnología, UNAM**

**Dr. Francisco Ruíz Terán  
Facultad de Química, UNAM**

**Ciudad Universitaria, CD. MX. MAYO, 2021**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

# Agradecimientos

Agradezco por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo a  
DGAPA UNAM proyectos PAPIIT IA 204118 y IN219520  
Facultad de Química UNAM PAIP 5000-9153

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, por la beca otorgada para la  
realización de mis estudios de Maestría.

A los miembros del Comité Tutor:  
Dr Edmundo Castillo Rosales, Dr Francisco Ruíz Terán y Dra Carmina Montiel Pacheco,  
quien también funge como mi tutora de tesis.

A los integrantes del H. Jurado por su valiosa revisión y evaluación de esta tesis.

Un especial agradecimiento a la Dra Clarita Olvera Carranza y a su alumna, la M en C.  
Flor de María García Paz por su asesoría y colaboración dentro de este trabajo.

A Alexandra Elbakyan, la Robin Hood de la ciencia, quien fielmente lucha para que el  
conocimiento científico sea de acceso libre e igualitario.

# Dedicatoria

A mi familia, gracias por todo su apoyo, su amor incondicional, su paciencia y sus regaños para que llegase este día. De verdad, gracias por impulsarme a ser mejor y a creer en lo que me propongo por más irreal que parezca, sé que siempre estarán ahí para mí alentándome. Los amo mucho, Dad, Mae, Alexa y Lau.

A mis amig@s y compañer@s de Maestría: Aless, Charly C., Javiere, David R., Richie, Elisa, Laura, Melissa, Fernanda, Sophie, Willy, ... Compartir clases y proyectos con ustedes fue una gran aventura.

A mis grandes amigos y amigas: Pamm, Aarii, GabyMon, Fanna, Marixu, Criss, Joab, Rodri, Charls, Chucho, Alan, Javier, De Ita, Coshi, Richard D, Cadaa, JuanMa, Iván y mi Lío por su apoyo, su cariño y su amistad. Los y las quiero mucho.

A mis amigas de toda la vida, Mishel, Priscila, Mary G, Lorena, Yutzil, Rie y Tepha. También a ti, Miyagui de mi corazón.

A mis amigos del Laboratorio 314 ... Maestro Jon, muchas gracias por todo lo aprendido, los consejos, las advertencias, los enojos y las risas, encontré un gran compañero y amigo en ti. Alesita, gracias por todo tu apoyo, por compartir conmigo grandes momentos de frustración y alegría, gracias por ser una bella amiga y humana. Alamcito, eres de las personas más increíbles que llegó en esta etapa tan bonita a mi vida, gracias por crecer conmigo como amigo y persona. Sam, gracias por ser siempre tú.

A mis demás compañeros del laboratorio: Armando, Edna, Laura, Diego, Angelito, Marco, Fer, Itzel y Karlita, por compartir su tiempo y espacio en sacar nuestros respectivos proyectos, así como engordar juntos. Los quiero y los estimo mucho, chicos y chicas. ¡Mucho éxito en lo que se propongan!

A mi asesora, Mina, muchas gracias por todo: los regaños, las presiones, las críticas, las tardes futboleras, las risas, las anécdotas, pero en especial, gracias por confiar en mí. Sé que aún falta mucho por recorrer.

Y finalmente, quiero agradecerles a dos amigos muy especiales, que aún a la distancia, conservo con mucho cariño los momentos que compartimos durante su breve estancia, Frederik y Angelique. Cada uno ocupa un lugar especial en mi corazón, sé que pronto nos volveremos a ver y tendremos nuevas historias por contar. Vielen Dank und ich liebe dich sehr, Flagschiff und Gänseblümchen!

# ÍNDICE

Contenido	Página
Resumen.....	I
<b>I. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>II. Antecedentes.....</b>	<b>3</b>
<b>II.1. Prebióticos.....</b>	<b>3</b>
<b>II.1.1. Tipos y fuentes de prebióticos .....</b>	<b>3</b>
<b>II.1.2. Producción de prebióticos .....</b>	<b>4</b>
<b>II.2. Fructooligosacáridos (FOS).....</b>	<b>5</b>
<b>II.2.1. Producción de FOS .....</b>	<b>7</b>
<b>II.2.1.1. Hidrólisis Química .....</b>	<b>7</b>
<b>II.2.1.2. Hidrólisis Enzimática.....</b>	<b>8</b>
<b>II.3. Glicosil Hidrolasas (GH) .....</b>	<b>8</b>
<b>II.3.1. Mecanismo de reacción.....</b>	<b>9</b>
<b>II.3.2. Fructosiltransferasas (FTasas) .....</b>	<b>10</b>
<b>II.3.3. <math>\beta</math>-Fructofuranosidasas (<math>\beta</math>-FFasas).....</b>	<b>11</b>
<b>II.3.4. Residuos del sitio activo y su estructura cuaternaria             del clan GH-J.....</b>	<b>11</b>
<b>II.4. Inulinasas.....</b>	<b>14</b>
<b>II.5. <i>Kluyveromyces</i> sp.....</b>	<b>15</b>
<b>II.5.1. <i>Kluyveromyces marxianus</i> AZ8 .....</b>	<b>19</b>
<b>III. Hipótesis y Objetivos .....</b>	<b>20</b>
Objetivo general.....	20
Objetivos particulares .....	20
<b>IV. Materiales y Métodos.....</b>	<b>21</b>
<b>IV.1. Producción de la exoinulinasa a partir de         <i>Kluyveromyces marxianus</i> AZ8 .....</b>	<b>21</b>
<b>IV.1.1. Crecimiento de la cepa.....</b>	<b>21</b>
<b>IV.1.2. Verificación de la pureza del medio.....</b>	<b>21</b>

<b>IV.2.</b>	Evaluación de la actividad enzimática y determinación de proteína	22
<b>IV.2.1.</b>	Método de Bradford	22
<b>IV.2.2.</b>	Determinación de la actividad hidrolítica de la enzima (extracto crudo, extracto liofilizado, enzima pura)	21
<b>IV.3.</b>	Purificación de la exo-inulinasa de <i>Kluyveromyces marxianus</i> AZ8	24
<b>IV.3.1.</b>	Cromatografía por exclusión molecular	24
<b>IV.3.1.1.</b>	Determinación del peso molecular de la enzima	24
<b>IV.3.2.</b>	Monitoreo del proceso de purificación	25
<b>IV.3.2.1.</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE)	25
<b>IV.3.2.1.1.</b>	Tinción de Azul de Coomassie (CBB) del gel de electroforesis SDS-PAGE	27
<b>IV.3.2.1.2.</b>	Tinción de Schiff (Glicosilación)	28
<b>IV.3.2.1.3.</b>	Identificación de los productos de reacción por Cromatografía de capa fina (CCF)	28
<b>IV.4.</b>	Actividad de transfructosilación a partir de la exo-inulinasa pura de <i>Kluyveromyces marxianus</i> AZ8	28
<b>IV.4.1.</b>	Ensayos enzimáticos de transfructosilación	28
<b>IV.4.1.1.</b>	Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad de transfructosilación	29
<b>IV.4.2.</b>	Métodos cromatográficos para la identificación de FOS	29
<b>IV.4.2.1.</b>	Cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD)	29
<b>V.</b>	Resultados y Discusión	30
<b>V.1.</b>	Obtención y purificación de la exo-inulinasa de <i>Kluyveromyces marxianus</i> AZ8	30
<b>V.1.1.</b>	Purificación de la exo-inulinasa usando cromatografía de exclusión molecular	31
<b>V.1.2.</b>	Electroforesis SDS-PAGE del proceso de purificación por exclusión molecular	32
<b>V.1.3.</b>	Determinación de la glicosilación en la inulinasa por medio de la tinción de Schiff	33

<b>V.1.4.</b> Reacción de hidrólisis enzimática, análisis por cromatografía en capa fina .....	36
<b>V.2.</b> Reacciones de transfructosilación con la exo-inulinasa ACH1 proveniente de <i>Kluyveromyces marxianus</i> AZ8 .....	37
<b>V.2.1.</b> Efecto de la concentración de sacarosa sobre la actividad de transfructosilación enzimática .....	42
<b>V.2.2.</b> Efecto del tiempo de reacción en la actividad de transfructosilación enzimática .....	46
<b>V.2.3.</b> Efecto del pH sobre la actividad de transfructosilación enzimática .....	50
<b>V.2.4.</b> Efecto de la temperatura sobre la actividad de transfructosilación enzimática .....	53
<b>VI.</b> Conclusiones .....	58
Perspectivas .....	58
<b>VII.</b> Referencias .....	59
ANEXOS .....	65



# Lista de Tablas y Figuras

<b>Tabla 1.</b> Tipos y fuentes de prebióticos.....	4
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de FOS.....	6
<b>Tabla 3.</b> Fuentes microbianas y vegetales de enzimas productoras de oligosacáridos.....	8
<b>Tabla 4.</b> Motivos conservados en los sitios activos de las estructuras resueltas ...	13
<b>Tabla 5.</b> Características de los procesos enzimáticos para la producción de FOS .....	14
<b>Tabla 6.</b> Condiciones de reacción para la actividad de transfructosilación reportadas .....	18
<b>Tabla 7.</b> Tabla de formulación de medio mínimo .....	21
<b>Tabla 8.</b> Volúmenes utilizados y tiempo de incubación para las diferentes muestras.....	23
<b>Tabla 8.1.</b> Volúmenes utilizados para los controles de reacción enzimática.....	23
<b>Tabla 9.</b> Composición química para la preparación del gel de electroforesis SDS-PAGE.....	26
<b>Tabla 10.</b> Tabla de purificación de la inulinasa ACH1 de <i>Kluyveromyces marxianus</i> AZ8 .....	30
<b>Tabla 11.</b> Pesos moleculares de inulasas extracelulares provenientes de <i>Kluyveromyces marxianus</i> sp .....	35
<b>Tabla 12.</b> Nomenclatura del <b>Estándar P95</b> : FOS del tipo inulina .....	39
<b>Figura 1.</b> Mecanismo de acción general en la familia GH32.....	10
<b>Figura 2.</b> Producción de FOS a partir de sacarosa por FTasas.....	11
<b>Figura 3.</b> Estructuras tridimensionales de las enzimas de las familias GH68 y GH32 .....	12
<b>Figura 3.1.</b> Sitio catalítico del dominio $\beta$ -propela de las enzimas de las familias GH68 y GH32 .....	12

<b>Figura 4.</b> Hidrólisis enzimática de inulina para la producción de utilizando endo-inulinasas .....	15
<b>Figura 5.</b> Estructura tridimensional de la exo-inulinasas INU1 de <i>Kluyveromyces marxianus</i> DMKU3-1042 .....	17
<b>Figura 6.</b> Sitio activo del dominio $\beta$ -propela, donde se ubica la triada catalítica .....	17
<b>Figura 7.</b> Cromatograma de exclusión molecular en la columna Superdex 200S .....	31
<b>Figura 8.</b> Electroforesis SDS-PAGE .....	33
<b>Figura 9.</b> Tinción de Schiff.....	34
<b>Figura 10.</b> Análisis por CCF de las reacciones enzimáticas de las distintas muestras obtenidas durante el proceso de purificación .....	36
<b>Figura 11.</b> Análisis por CCF de las reacciones enzimáticas de transfructosilación a diferentes tiempos de reacción con la enzima pura .....	37
<b>Figura 12.</b> Análisis por CCF de las reacciones enzimáticas de transfructosilación a diferentes tiempos de reacción con el extracto liofilizado.....	38
<b>Figura 13.</b> Análisis de las reacciones enzimáticas para la actividad de transfructosilación a través de la técnica HPAEC-PAD.....	40
<b>Figura 13.1.</b> Estructuras posibles de FOS ramificados o lineales.....	41
<b>Figura 14.</b> Análisis por CCF de las reacciones enzimáticas de transfructosilación a diferentes tiempos de reacción y mayor concentración del sustrato .....	42
<b>Figura 15.</b> Análisis de las reacciones enzimáticas para la actividad de transfructosilación del extracto liofilizado a diferentes % m/v de sacarosa a través de la técnica HPAEC-PAD .....	43
<b>Figura 16.</b> Análisis de las reacciones enzimáticas para la actividad de transfructosilación del extracto liofilizado a diferentes % m/v de sacarosa a través de la técnica HPAEC-PAD .....	45
<b>Figura 17.</b> Análisis por CCF de las reacciones enzimáticas de transfructosilación a diferentes tiempos cortos de reacción .....	46
<b>Figura 18.</b> Análisis de las reacciones enzimáticas para la actividad de transfructosilación a diferentes tiempos cortos de reacción, a través de la técnica HPAEC-PAD .....	48

<b>Figura 19.</b> Análisis de las reacciones enzimáticas para la actividad de transfructosilación a diferentes tiempos cortos de reacción, a través de la técnica HPAEC-PAD .....	49
<b>Figura 20.</b> Análisis por CCF de las reacciones enzimáticas de transfructosilación a diferentes pH de reacción .....	50
<b>Figura 21.</b> Análisis de las reacciones enzimáticas para la actividad de transfructosilación a diferentes pH de reacción, a través de la técnica HPAEC-PAD .....	51
<b>Figura 22.</b> Análisis de las reacciones enzimáticas para la actividad de transfructosilación a diferentes pH de reacción, a través de la técnica HPAEC-PAD .....	52
<b>Figura 23.</b> Análisis por CCF de las reacciones enzimáticas de transfructosilación a diferentes temperaturas de reacción .....	53
<b>Figura 24.</b> Análisis de las reacciones enzimáticas para la actividad de transfructosilación a diferentes temperaturas de reacción, a través de la técnica HPAEC-PAD .....	55
<b>Figura 25.</b> Análisis de las reacciones enzimáticas para la actividad de transfructosilación a diferentes temperaturas de reacción, a través de la técnica HPAEC-PAD .....	56

# Abreviaturas

<b>% m/v</b>	Porcentaje masa/volumen
<b>% v/v</b>	Porcentaje volumen/volumen
<b>°C</b>	grados Celsius
<b>µg</b>	microgramos
<b>µL</b>	microlitros
<b>µmol</b>	micromoles
<b>ABS</b>	Absorbancia
<b>AGCC</b>	Ácidos grasos de cadena corta
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>C-</b>	Carboxilo
<b>C2</b>	Acetato
<b>C3</b>	Propionato
<b>C4</b>	Butirato
<b>CBB</b>	Tinción con azul de Coomassie brillante (por sus siglas en inglés)
<b>CCF</b>	Cromatografía por capa fina
<b>D o Asp</b>	Aspartato
<b>Da</b>	Daltons
<b>DNS</b>	Ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzoico
<b>DP</b>	Grado de polimerización
<b>E o Glu</b>	Glutamato
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>β-FFasa</b>	β-Fructofuranosidasa
<b>FOS</b>	Fructooligosacáridos
<b>FPLC</b>	Cromatografía Líquida de Proteínas Rápida (por sus siglas en inglés)
<b>Fru</b>	Fructosa
<b>FTasa</b>	Fructosiltransferasa
<b>GF<sub>2</sub></b>	1-kestosa
<b>GF<sub>3</sub></b>	1-nistosa
<b>GF<sub>4</sub></b>	Fructofuranosil nistosa
<b>Glc</b>	Glucosa
<b>GOS</b>	Galactooligosacáridos
<b>GRAS</b>	Generalmente Reconocidos Como Seguros (por sus siglas en inglés)
<b>h</b>	horas
<b>HMF</b>	Hidroximetilfurfural
<b>HPAEC-PAD</b>	Cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (por sus siglas en inglés)
<b>HPLC</b>	Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (por sus siglas en inglés)
<b>ISAPP</b>	Asociación Científica Internacional de Probiótico y Prebióticos (por sus siglas en inglés)

<b>K.</b>	<i>Kluyveromyces</i>
<b><math>K_a</math></b>	Factor $K_a$
<b><math>K_{cat}</math></b>	Constante específica
<b>kDa</b>	kiloDaltons
<b>kg</b>	kilogramo
<b><math>K_m</math></b>	Constante de Michaelis-Menten
<b>L</b>	litro
<b>M</b>	molar
<b>mAU</b>	mili-absorbancia UV
<b>mg</b>	miligramos
<b>min</b>	minutos
<b>mL</b>	mililitros
<b>mM</b>	milimolar
<b>MPa</b>	megapascal
<b>N</b>	Asparagina
<b>N-</b>	Amino
<b>n-BuOH</b>	n-Butanol
<b>nm</b>	nanómetros
<b>PAS</b>	Tinción Ácido Peryódico-Schiff (por sus siglas en inglés)
<b>R</b>	Arginina
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de amonio
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (por sus siglas en inglés)
<b>sp.</b>	especie
<b>TEMED</b>	Tetrametiletilendiamina
<b>U</b>	unidad de actividad enzimática
<b>V</b>	Volts
<b>var.</b>	variedad
<b><math>V_{m\acute{a}x}</math></b>	Velocidad máxima
<b>W</b>	Triptófano

## RESUMEN

Generalmente, los prebióticos se caracterizan por ser carbohidratos no digeribles, cuyo consumo alimentario ha demostrado presentar efectos benéficos en la salud humana, dado que estos compuestos se encuentran en bajas concentraciones en los alimentos de manera natural. La industria alimentaria ha buscado formas alternas de producirlos a gran escala. Entre los prebióticos más estudiados están los fructooligosacáridos (FOS), que son oligómeros de fructosa (Fru), cuyo grado de polimerización (DP) va de 3 a 7 unidades. Estos oligosacáridos se unen a través de enlaces glicosídicos del tipo  $\beta$ -(2,1) y/o  $\beta$ -(2,6) confiriéndoles la propiedad de presentar una estructura ramificada o lineal.

Existen dos rutas principales para la producción de FOS, el químico y el enzimático, siendo este último el que produce mejores resultados. En la ruta enzimática hay dos maneras de producirlos, ya sea a través de la reacción de hidrólisis o de la transfructosilación. Las enzimas que se encargan de catalizar la reacción de síntesis de FOS utilizando sacarosa o algún polifructano como sustrato principal se denominan fructosiltransferasas (FTasa; inulosacarasa y levansacarasa) y  $\beta$ -fructofuranosidasas ( $\beta$ -FFasa; inulinasa, levanasa e invertasa). Sin embargo, la naturaleza de los FOS depende tanto de la enzima como de las condiciones del medio de reacción (temperatura, pH, concentración del sustrato y el uso de medios no convencionales).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar si la inulinasa ACH1, producida por *Kluyveromyces marxianus* AZ8, es capaz de realizar la reacción de transfructosilación para producir FOS utilizando como sustrato principal a la sacarosa analizando diferentes condiciones de reacción. Para lograr este objetivo, la enzima ACH1 fue aislada y purificada utilizando cromatografía por exclusión molecular. Se evaluó la actividad hidrolítica de la enzima utilizando agavina como sustrato. Así mismo, mediante la cromatografía de exclusión molecular, se determinó su peso molecular (288 kDa, aproximadamente). Una vez purificada y caracterizada su actividad enzimática, se evaluaron diversas condiciones de reacción para llevar a cabo la transfructosilación.

Se emplearon altas concentraciones de sacarosa (10, 15 y 45% m/v), diferentes temperaturas (25 a 70°C) y valores de pH (3 a 8). Finalmente, los FOS sintetizados fueron caracterizados por la técnica HPAEC-PAD, comprobando que la exo-inulinasa ACH1 de *K. marxianus* AZ8 presenta actividad de transfructosilación en un medio de reacción al 45% (m/v) de sacarosa, a una temperatura de 60°C y a un pH de 6 produciendo FOS que constan de 3 a 5 unidades de Fru.

## ABSTRACT

Prebiotics are characterized for being non-digestible carbohydrates, whose consumption has shown beneficial effects on human health. These compounds are present in food in low concentrations. However, the food industry has been looking for alternative ways to produce these compounds in higher yields. The most studied prebiotics are the fructooligosaccharides (FOS), which are fructose (Fru) oligomers with a degree of polymerization (DP) from 3 to 7 units. Fructose units in these oligosaccharides are bonded by  $\beta$ -(2,1) and/or  $\beta$ -(2,6) glycosidic linkages and their structure can be linear or branched.

There are two main production methods for FOS: chemical and enzymatic, with the second being better. In the enzymatic method, FOS can be produced by hydrolysis or transfructosylation reaction. Enzymes that catalyze FOS biosynthesis using sucrose or some polyfructan as substrate are known as fructosyltransferases (FTase; inulosucrases and levansucrases) and  $\beta$ -fructofuranosidases ( $\beta$ -FFase; inulinase, levanase and invertase). However, the structure (linear or branched) of FOS depends on both, the enzyme, and the reaction conditions (temperature, pH, substrate concentration and non-conventional mediums).

The aim of this work was to study if the inulinase (ACH1), isolated from *Kluyveromyces marxianus* AZ8, can catalyze transfructosylation reaction to produce FOS using sucrose as main substrate. To achieve this purpose, the ACH1 enzyme was isolated from *K. marxianus* AZ8 and purified by molecular exclusion chromatography. The enzyme hydrolytic activity was evaluated using agavine as substrate. Likewise, enzyme molecular weight (288 kDa approximately) was determined by molecular exclusion chromatography. Once purified and characterized the enzyme, in order to determine transfructosylation activity, several reaction conditions were evaluated.

High concentrations of sucrose (10, 15 and 45% w/v), different temperatures (25 to 70°C) and pH values (3 to 8) were assayed. The best reaction conditions were sucrose 45% (w/v), temperature 60°C and pH 6 producing FOS of 3 to 5 Fru units. Finally, the synthesized FOS were characterized by HPAEC-PAD technique, verifying that the exo-inulinase ACH1 isolated from *K. marxianus* AZ8 shows transfructosylation activity.

## I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha introducido el concepto de que el consumo de alimentos no sólo es necesario para el aporte energético y la nutrición básica, sino también para generar un efecto benéfico a la salud del consumidor dando como resultado el desarrollo de los alimentos funcionales.

Un alimento funcional es aquel nutrimento o compuesto alimenticio, cuyo consumo frecuente es benéfico para la salud y/o reduce el riesgo de enfermedades, además de mantener el bienestar físico y mental de las personas que los consumen (Roberfroid & Slavin, 2000). Dentro de este tipo de alimentos se encuentran los prebióticos, los cuales se definen como un ingrediente alimenticio no digerible que afecta benéficamente la salud del hospedero a través de la estimulación selectiva del desarrollo y/o la actividad de uno o un número determinado de bacterias (probióticos) en el colon (Gibson & Roberfroid, 1995).

Existe una gran variedad de carbohidratos no digeribles que se reportan como prebióticos, entre ellos se pueden destacar a los fructooligosacáridos (FOS), moléculas de 3 a 7 unidades de Fru (Silva *et al.*, 2013). Estos compuestos tienen propiedades funcionales como edulcorantes de bajo aporte calórico no cariogénico, ayudan a la absorción de iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) en el colon, así como la estimulación del desarrollo de bacterias ácido-lácticas (bifidobacterias y lactobacilos) llamadas probióticos (Davani-Davari *et al.*, 2019).

Estos oligosacáridos de Fru se pueden producir mediante dos rutas, la química y la enzimática. La ruta química implica el uso de ácidos y/o bases generando como subproductos a los hidroximetilfurfurales (HMF), compuestos tóxicos que reducen la cantidad efectiva de azúcares disponibles y dan una coloración indeseable al producto final (Kochhar, Gupta, & Kaur, 1999). Mientras que la ruta enzimática se realiza a través del uso de enzimas que presentan actividad de hidrólisis y/o actividad de transfructosilación, además, de que no generan subproductos no deseados (Ricca *et al.*, 2007).

Las enzimas que se encargan de sintetizar a los FOS, utilizando sacarosa como sustrato principal, son las fructosiltransferasas (FTasa) o las  $\beta$ -fructofuranosidasas ( $\beta$ -FFasa), las cuales se pueden obtener de fuentes como plantas, bacterias, levaduras y hongos filamentosos (Maiorano *et al.*, 2008).

Se ha reportado que, a altas concentraciones de sacarosa, algunas  $\beta$ -FFasas como las inulinasas son capaces de catalizar la reacción de transfructosilación para obtener FOS tales como 1-kestosa ( $\text{GF}_2$ ), 1-nistosa ( $\text{GF}_3$ ) y fructofuranosil nistosa ( $\text{GF}_4$ ) (Roberfroid & Slavin, 2000; Sánchez *et al.*, 2008; Vega & Zuniga-



Hansen, 2014). La reacción catalizada se basa en la transfructosilación de la sacarosa, para ello, este sustrato tiene que ser hidrolizado y una molécula de fructosa es transferida a un aceptor que puede ser la propia sacarosa u otro FOS (Vega & Zuniga-Hansen, 2014).

En este trabajo se aborda la síntesis de FOS catalizada por una inulinasa, ACH1, usando concentraciones altas de sacarosa, así como temperaturas superiores a 50°C y diferentes valores de pH. La inulinasa empleada proviene de *Kluyveromyces marxianus* AZ8, levadura aislada del bagazo de agave mezcalero.

## II. ANTECEDENTES

### II.1. PREBIÓTICOS

Los prebióticos son un grupo de nutrientes, cuya degradación es realizada por la microbiota intestinal del cuerpo humano. En los últimos años, el estudio de estos nutrientes, con relación a la salud humana, ha sido de gran interés dado que su consumo genera beneficios en ella. De forma natural, los prebióticos se pueden obtener a partir de la dieta, entre sus fuentes principales tenemos al espárrago, betabel, ajo, chicoria, cebolla, achicoria de Jerusalén, trigo, miel, plátano, jitomate, soya, leche de vaca, chícharos, frijoles, etcétera y, recientemente, de algas marinas y microalgas (Varzakas *et al.*, 2018).

En 1995, el concepto de prebiótico fue introducido por Glenn Gibson y Marcel Roberfroid, quienes lo definieron como “un ingrediente alimentario no digerible que afecta benéficamente al huésped estimulando de forma selectiva el crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon, y así mejora la salud del huésped”. Con base en esta definición, sólo algunos compuestos pertenecientes al grupo de carbohidratos, como los fructanos de cadena corta y larga (FOS e inulina), lactulosa y galactooligosacáridos (GOS), pueden clasificarse como prebióticos. Sin embargo, en el 2008, durante la sexta reunión de la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP, por sus siglas en inglés), se definió a los “prebióticos dietarios” como “un ingrediente selectivamente fermentado que da a lugar a cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal, confiriendo así beneficios a la salud del huésped” (Gibson *et al.*, 2010).

#### II.1.1. Tipos y fuentes de prebióticos

Existen varios tipos de prebióticos (**Tabla 1**), los cuales en su mayoría son un subconjunto de grupos de carbohidratos no digeribles, principalmente oligosacáridos (Davani-Davari *et al.*, 2019). Para que estos compuestos sean considerados como prebióticos deben cumplir ciertos criterios: el primero, es ser resistentes al ácido gástrico y a las enzimas digestivas de origen mamífero; el segundo, es la susceptibilidad a la fermentación por bacterias intestinales y el tercero, tener la capacidad para mejorar la viabilidad y/o actividad de los microorganismos benéficos (Gibson *et al.*, 2010).

**Tabla 1.** Tipos y fuentes de prebióticos

<b>Tipo de prebiótico</b>	<b>Fuente de prebiótico</b>	<b>Referencia</b>
<b>Fructooligosacáridos</b>	Espárrago, betabel, ajo, chicoria, cebolla, achicoria de Jerusalén, trigo, miel, plátano, cebada, jitomate y centeno	Sangeetha <i>et al.</i> (2005)
<b>Isomaltulosa</b>	Miel, jugo de caña de azúcar	Lina <i>et al.</i> , (2002)
<b>Xilooligosacáridos</b>	Brotos de bambú, frutas, vegetales, leche, miel y salvado de trigo	Vázquez <i>et al.</i> , (2000)
<b>Galactooligosacáridos</b>	Leche humana y leche de vaca	Alander <i>et al.</i> (2001)
<b>Ciclodextrinas</b>	Glucanos solubles en agua	Singh, Sharma, and Banerjee (2002)
<b>Oligosacáridos de rafinosa</b>	Semillas de legumbres, lentejas, chícharos, frijoles, garbanzos, malva compuesta y mostaza	Johansen, Glitso, and Knudsen (1996)
<b>Oligosacáridos de soya</b>	Haba de soya	Mussatto and Mancilha (2007)
<b>Lactulosa</b>	Leche	Villamiel <i>et al.</i> , (2002)
<b>Lactosacarosa</b>	Síntesis enzimática	Kawase <i>et al.</i> , (2001)
<b>Maltooligosacáridos</b>	Almidón	Kaneko <i>et al.</i> , (1994)
<b>Isomaltooligosacáridos</b>	Almidón	Kaneko <i>et al.</i> , (1994)
<b>Arabinoxilooligosacáridos</b>	Salvado de trigo	Eeckhaut <i>et al.</i> , (2008), Grootaert <i>et al.</i> , (2007)
<b>Dextrina resistente a enzimas</b>	Almidón de papa	Barczynska <i>et al.</i> , (2012)

Tomado de: Al-Sheraji *et al.*, 2013

A pesar de que los galactooligosacáridos (GOS), los fructooligosacáridos (FOS) y la inulina son los prebióticos más estudiados, existen algunas evidencias que los prebióticos no son únicamente carbohidratos no digeribles (Davani-Davari *et al.*, 2019), sino que también existen otros compuestos de carácter prebiótico, tal es el caso de los flavonoles derivados de la cocoa, los cuales tienen la capacidad de estimular el desarrollo de bacterias ácido lácticas (Tzounis *et al.*, 2011).

### **II.1.2. Producción de prebióticos**

Debido a que los prebióticos se encuentran de manera natural en los alimentos a bajas concentraciones, la industria alimentaria ha buscado alternativas para producirlos a gran escala (Al-Sheraji *et al.*, 2013; Panesar *et al.*, 2013). Estos métodos de producción industrial consisten en generar oligosacáridos de fuentes naturales a través de la hidrólisis de polisacáridos como los fructanos, también en

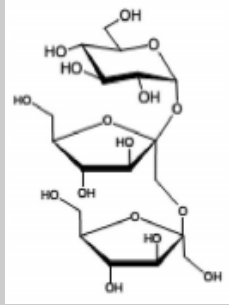
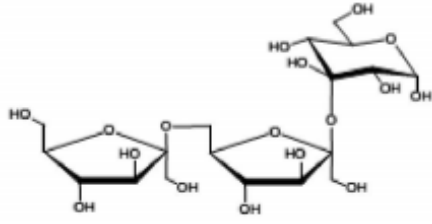
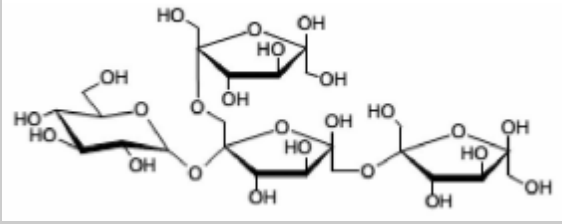
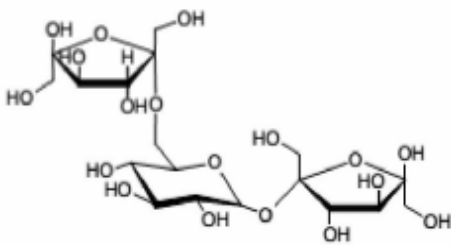
la síntesis enzimática y química a partir de disacáridos como la lactosa y la sacarosa, así como en la extracción directa para producir oligosacáridos de soya y rafinosa, y la reacción de isomerización que produce la lactulosa, por mencionar algunos métodos (Mussatto & Mancilha, 2007).

## **II.2. FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS (FOS)**

Dentro de este tipo de prebióticos encontramos a los fructooligosacáridos (FOS), que son oligómeros de fructanos, los cuales se componen de 3 a 7 unidades de fructosa (Fru) unidos a través de enlaces glicosídicos  $\beta$ -(2,1) o  $\beta$ -(2,6) o bien,  $\beta$ -(2,1) y  $\beta$ -(2,6), así como de una molécula D-glucosa (Glc) terminal unida a la Fru por medio de un enlace glicosídico  $\alpha$ -(2,1) (Silva *et al.*, 2013). Estos polímeros de fructosilo poseen un grado de polimerización (DP) menor a 10 unidades de Fru, pueden tener un amplio intervalo de tamaños y, por lo tanto, diversos pesos moleculares.

Los FOS se pueden clasificar de acuerdo a su estructura y al tipo de enlaces que presentan entre sus unidades de Fru como se muestra en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Clasificación de FOS

Tipo de FOS	Unidades de composición	Tipo de enlace	Estructura química
Tipo de Inulina	$\beta$ -D-fructofuranosil	Lineal $\beta$ -(2,1)	 <p>1-kestosa</p>
Tipo de Levana	$\beta$ -D-fructofuranosil	Lineal $\beta$ -(2,6)	 <p>6-kestosa</p>
Tipo de Levana mixto	$\beta$ -D-fructofuranosil Se unen 2 unidades en la Fru de la sacarosa	$\beta$ -(2,6) $\beta$ -(2,1)	 <p>Bifurcosa</p>
Tipo de Neoserias	$\beta$ -D-fructofuranosil Se une en el C6 de Glu de la sacarosa	Lineal $\beta$ -(2,1)	 <p>Neokestosa</p>

(Linde *et al.*, 2012; Monsan & Ouarné, 2009; Roberfroid & Slavin, 2000)

Por otra parte, sobre estos oligosacáridos de Fru han aumentado el interés de estudiarlos, así como de producirlos debido a las propiedades benéficas que tienen sobre la salud. Entre estas propiedades, se reporta que estos compuestos

estimulan selectivamente el crecimiento de *Bifidobacteria* y *Lactobacillus* sp en el colon humano, dado a la asociación de comensalismo dentro del huésped. La degradación de FOS por este grupo de bacterias anaeróbicas específicas trae como consecuencia la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), como acetato (C2), propionato (C3) y butirato (C4) propiciando la disminución del pH en el colón y, subsecuentemente, el incremento en la absorción de iones calcio ( $Ca^{2+}$ ) y magnesio ( $Mg^{2+}$ ), así como de otros nutrimentos (Scholz-Ahrens *et al.*, 2007; Tazoe *et al.*, 2008).

Además, los FOS tienen aplicaciones dentro de la industria alimentaria y farmacéutica. En la primera, se utilizan como sustituto de azúcar debido a su índice de dulzor (35% de dulzor) (Madrigal, 2007), cuyo aporte energético es de 1.5 a 2.0 kcal/g (Kumar, 2018); aparte de ser compuestos no cariogénicos y se emplean como espesantes, emulsificantes y gelificantes, mientras que, en la segunda, se usan como aditivos o coadyuvantes en medicamentos (Benkeblia, 2014).

### **II.2.1. Producción de FOS**

Debido a la complejidad de la estructura del carbohidrato y a sus múltiples sitios de unión, la producción de FOS con alta pureza no es un proceso sencillo. En la naturaleza, los FOS se encuentran en bajas concentraciones en diversos alimentos como la cebolla, el ajo, el plátano, la achicoria y en algunos cereales, entre otros (Gupta & Kaur, 1997; Van Loo *et al.*, 1995). Sin embargo, estos compuestos se pueden producir por dos procesos principales:

#### **II.2.1.1. Hidrólisis Química**

La hidrólisis química de la inulina de achicoria en condiciones de pH alcalino o ácido es una forma simple de producir FOS. Este método ofrece las ventajas de ser un proceso sencillo, de bajo costo, con un tiempo corto de reacción (2 a 6 horas), en el cual se pueden emplear temperaturas mayores a 60°C. Sin embargo, la reacción de hidrólisis puede generar subproductos no deseables, tales como el hidroximetilfurfural (HMF), el cual causa un color indeseado en el producto. A su vez, es necesario monitorear de forma constante los parámetros de reacción como la concentración del ácido, la temperatura y el tiempo en que se lleva a cabo; los rendimientos en la producción de FOS son bajos y la longitud de las cadenas obtenidas es variable (Vandamme & Derycke, 1983; Zittan, 1981).

### II.2.1.2. Hidrólisis Enzimática

Los procesos enzimáticos resultan ser una forma alternativa de producir FOS ante la hidrólisis química, puesto que ofrecen como ventajas el sintetizarlos sin generar subproductos adicionales, empleando condiciones de reacción suaves en cuanto a temperatura y pH. No obstante, es un proceso de alto costo y se necesitan grandes cantidades de enzima para su realización.

Existe una amplia gama de enzimas utilizadas para la producción de FOS, las cuales se obtienen de diversas fuentes vegetales y microbianas (**Tabla 3**) (Nemukula *et al.*, 2009).

**Tabla 3.** Fuentes microbianas y vegetales de enzimas productoras de oligosacáridos

<b>Fuentes de vegetales</b>	<b>Fuentes microbianas</b>
<i>Agave americana</i> (agave)	<i>Aureobasidium pullulans</i>
<i>Agave vera cruze</i> (agave)	<i>Aureobasium</i> sp.
<i>Asparagus officinalis</i> (raíz de espárrago)	<i>Arthrobacter</i> sp.
<i>Allium cepa</i> (bulbos de cebolla)	<i>Aspergillus japonicus</i>
<i>Cichorium intybus</i> (chicoria)	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Crinum longifolium</i> (hojas de remolacha azucarera)	<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>Helainthus tuberosus</i> (achicoria de Jerusalén)	<i>Aspergillus phoenicis</i>
	<i>Aspergillus sydowi</i>
	<i>Claviceps purpurea</i>
	<i>Fusarium oxysporium</i>
	<i>Penicillium frequentans</i>
	<i>Penicillium spinulosum</i>
	<i>Phytophthora parasitica</i>
	<i>Scopulariopsis</i> sp.
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

(Yun, 1996)

Algunos de los FOS comercializados como ingredientes alimentarios o suplementos nutricionales se sintetizan a partir de la sacarosa por la acción enzimática de las fructosiltransferasas (FTasas) o por la degradación enzimática de la inulina mediante inulinasas (Panesar *et al.*, 2014; Rastall, 2010). Este tipo de enzimas corresponden al grupo de las Glicosil Hidrolasas (GH), las cuales tienen como función principal hidrolizar a los carbohidratos.

### II.3. GLICOSIL HIDROLASAS (GH)

Las GH (glicosidasas, O-glicosil hidrolasas, EC 3.2.1.x), clasificadas de esta forma por el servidor Carbohydrate-Active enZYme (<http://www.cazy.org/>) (Coutinho & Henrissat, 1999; Henrissat, 1991), son enzimas que hidrolizan los enlaces

glicosídicos entre dos azúcares o entre un azúcar y su aglicona. A su vez, éstas participan en procesos biológicos como en el metabolismo de la pared celular, la biosíntesis de los glucanos, en la protección de la planta, en la señalización y movilización de las reservas de almacenamiento.

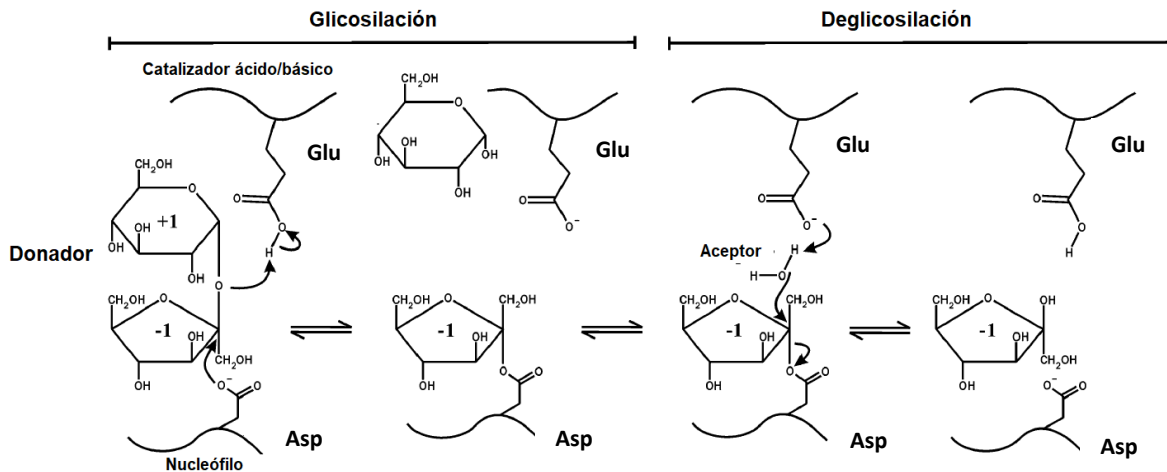
Hasta la fecha, las GH se dividen en 171 familias y en 18 clanes debido a que existe una relación directa entre la secuencia y las similitudes de su plegamiento (Shrivastava, 2020), dicha clasificación ayuda a entender las relaciones evolutivas entre estas enzimas. Dentro de los 18 clanes se encuentra el Clan GH-J, al cual pertenecen las familias GH32 y GH68 que, a pesar de su baja homología (<15% de identidad), comparten dominios conservados en los cuales se ubican sus respectivos aminoácidos catalíticos.

En el clan GH-J se encuentran las enzimas hidrolasas, pero también las no-Leloir del tipo transferasas (fructosiltransferasas), las cuales participan en la biosíntesis de fructanos. La familia GH32 comprende a un gran grupo de enzimas como las endo- y exo-inulinasas fúngicas y bacterianas, levanasas, exohidrolasas de fructanos vegetales (FEH) y enzimas biosintéticas de fructanos vegetales (FBE), también conocidas como  $\beta$ -fructofuranosidasas ( $\beta$ -FFasas). Mientras que la familia GH68 incluye a las levansacarasas e inulosacarasas bacterianas denominadas como fructosiltransferasas (FTasas) y algunas  $\beta$ -FFasas (Lammens *et al.*, 2008).

### ***II.3.1. Mecanismo de reacción***

Las hidrolasas que pertenecen a la familia GH32 y GH68, y que reconocen la configuración anomérica del carbono del sustrato, operan a través de un mecanismo de doble desplazamiento (**Figura 1**), utilizando un intermediario covalente enzimático (Reddy & Maley, 1996). Este mecanismo catalítico tiene como primer paso llevar a cabo la glicosilación a través de un ataque nucleofílico, en donde el ión carboxilato del nucleófilo ataca el carbono anomérico del azúcar (sustrato), formando un intermediario covalente fructosa-enzima. Mientras que el aspartato (**Asp**) catalizador ácido/base actúa como un ácido general, el cual dona un protón al grupo glicosil saliente. Para el segundo paso se debe realizar la deglicosilación, donde el glutamato (**Glu**) catalizador ácido/base actúa como una base general, eliminando un protón del aceptor de fructosilo entrante (agua o aceptor de azúcar apropiado como en el caso de las invertasas/FEH o FBE, respectivamente), que hidroliza el intermediario de fructosa-enzima.



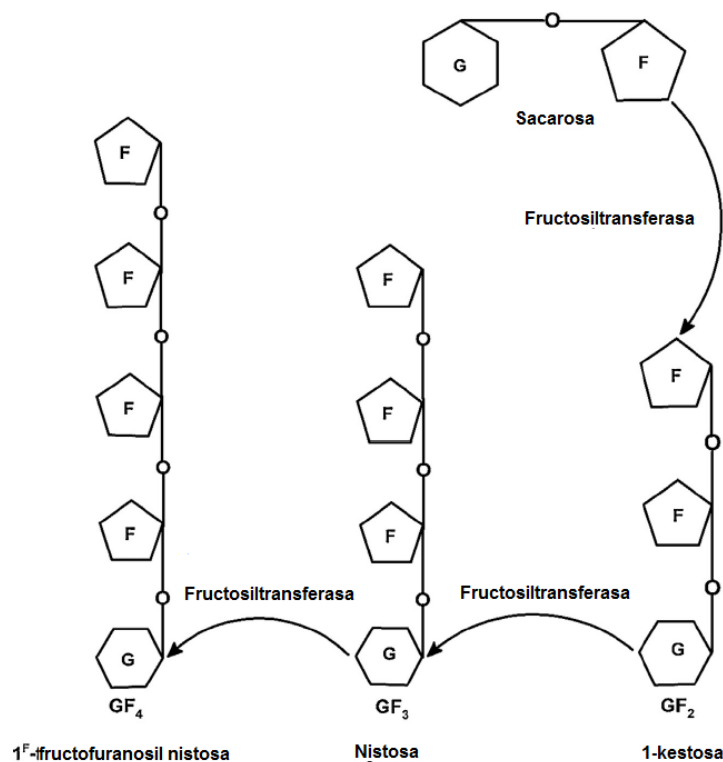


**Figura 1.** Mecanismo de acción general de la familia GH32 (Lammens *et al.*, 2008)

### II.3.2. Fructosiltransferasas (FTasas)

Dentro del clan GH-J se encuentra la familia GH68 a la que pertenecen las fructosiltransferasas (FTasas) (EC 2.4.1.9.), las cuales pueden catalizar dos tipos de reacción, la transglicosilación que es cuando la cadena de un fructano se usa como aceptor o la hidrólisis cuando el aceptor es una molécula de agua (Ozimek *et al.*, 2006).

Las FTasas tienen la capacidad de hidrolizar el enlace glicosídico de la sacarosa, cuya energía liberada de esta ruptura permite que una unidad de fructosilo libre se una a otra molécula de sacarosa o a moléculas más largas que contengan Fru produciendo FOS (**Figura 2**) (Sangeetha, Ramesh, & Prapulla, 2005). No obstante, una cantidad limitada de sacarosa se puede convertir en FOS a través de estas enzimas, dado que existe una inhibición de la actividad enzimática por parte de la Glc que se libera como producto de la reacción (Mussatto & Mancilha, 2007). Entre las FTasas microbianas más conocidas se encuentran las levansacarasas y las inulosacarasas, siendo en las primeras su reacción más específica sobre el enlace glicosídico  $\beta$ -(2,6), mientras que las segundas, lo es para los polímeros de enlace glicosídico  $\beta$ -(2,1) (Ozimek *et al.*, 2006).



**Figura 2.** Producción de FOS a partir de sacarosa por FTasas. (Singh *et al.*, 2016)

### II.3.3. $\beta$ -Fructofuranosidasas ( $\beta$ -FFasas)

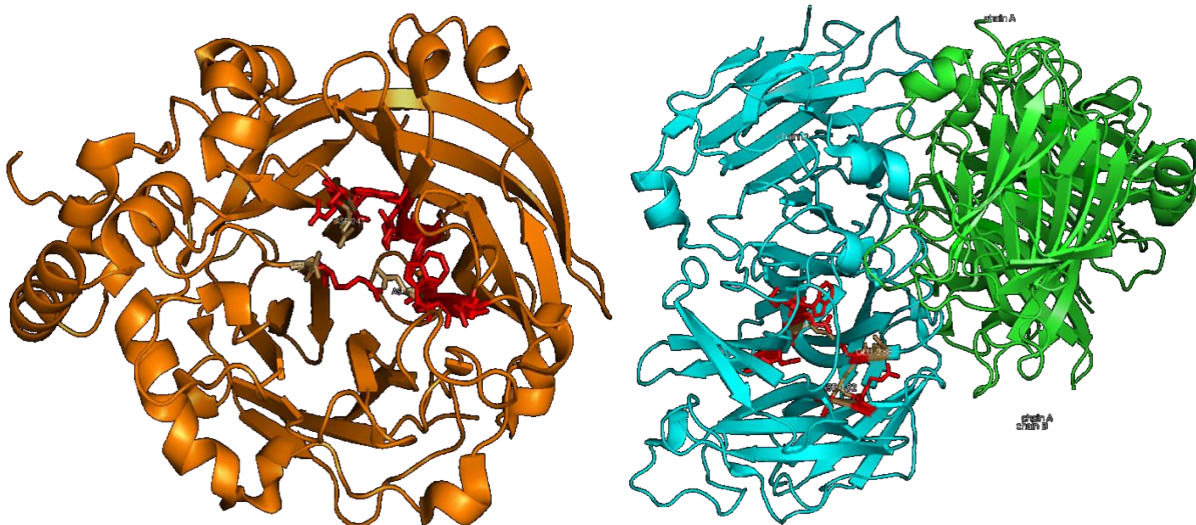
Las  $\beta$ -FFasas (EC 3.2.1.26) son enzimas microbianas de la familia GH32 que generalmente se secretan y tienen la capacidad de hidrolizar de forma natural a la sacarosa, inulina o levana (Singh & Singh, 2010). Algunas de estas enzimas de origen microbiano muestran una alta actividad de transfructosilación en la producción de FOS (Inthanavong, 2011; Li, 2014; Plou, de Segura, & Ballesteros, 2007). La síntesis de FOS a través de esta reacción enzimática se ve favorecida controlando las condiciones de reacción como son: una alta concentración de sustrato, altas temperaturas, en medios no convencionales para reducir la actividad del agua (Fernández *et al.*, 2004; Plou *et al.*, 2007).

### II.3.4. Residuos del sitio activo y su estructura cuaternaria del clan GH-J

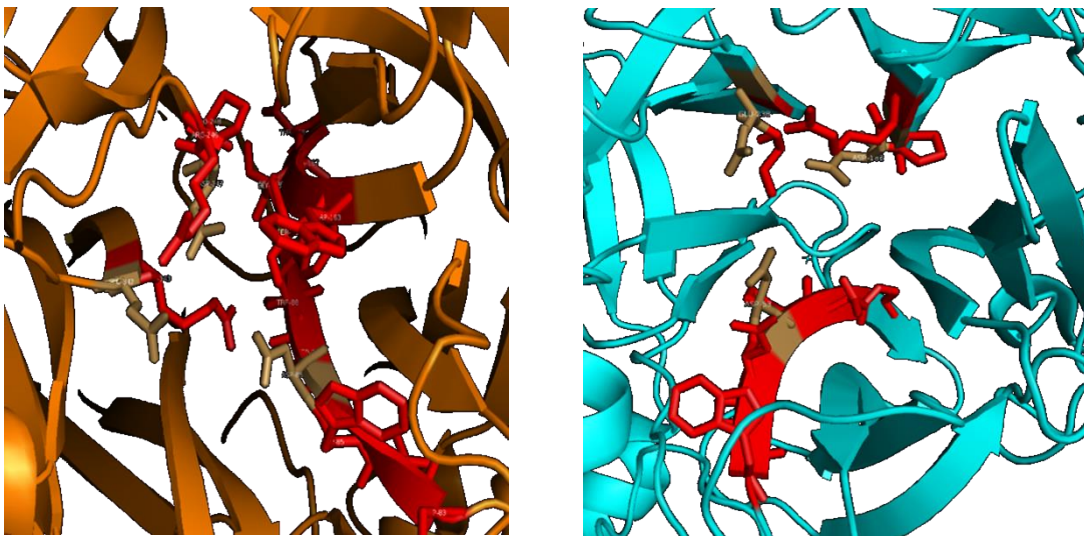
Las enzimas de estas familias, GH32 y GH68, se caracterizan por presentar en su estructura cuaternaria un dominio catalítico  $\beta$ -propela en común, dentro de éste se encuentran tres aminoácidos conservados ubicados en la cavidad del sitio catalítico.

Dicho dominio tiene una repetición de cinco hojas  $\beta$ , cada una consta de cuatro hebras antiparalelas con la clásica topología "W" alrededor del eje central que

encierra la cavidad del sitio activo cargada negativamente. Sin embargo, los miembros de la GH32 contienen un dominio extra C-terminal, el cual consiste en dos hojas  $\beta$  de seis hebras antiparalelas formando el  $\beta$ -sándwich, mientras que los de la GH68 carecen de éste (**Figura 3**).



**Figura 3. Estructuras tridimensionales de las enzimas de las familias GH68 y GH32.** El monómero de color naranja representa una FTasa (levansacarasa) con su dominio  $\beta$ -propela, mientras que el dímero de color verde con azul representa una  $\beta$ -FFasa (inulinasa) con su respectivo  $\beta$ -propela (N-terminal; azul) y  $\beta$ -sándwich (C-terminal; verde).



**Figura 3.1. Sitio catalítico del dominio  $\beta$ -propela de las enzimas de las familias GH68 y GH32.** En la FTasa (naranja) y  $\beta$ -FFasa (azul) se marcó en color ocre los tres aminoácidos catalíticos: dos aspartatos (**Asp** o **D**) y un glutamato (**Glu** o **E**), mientras que en color rojo representan a los motivos conservados.

Dentro del sitio catalítico existen tres residuos clave de aminoácidos ácidos, los cuales están rodeados de secuencias conservadas (motivos) en ambas familias (**Figura 3.1**). En el motivo WMNDPNG, donde **D** (aspartato) actúa como nucleófilo, mientras que en el motivo RDP, otro **D** actúa como estabilizador del estado de transición y el motivo EC, donde **E** (glutamato) actúa como el catalizador ácido/básico (**Tabla 4**). Estos aminoácidos son esenciales en la unión al sustrato y la reacción de hidrólisis, denominándolos como la triada catalítica (Álvaro-Benito *et al.*, 2012).

**Tabla 4.** Motivos conservados en los sitios activos de las estructuras resueltas

Familia	Microorganismo	Motivos			
		'WMNDPNG'	'WSGSAT'	'RDP'	'EC'
<b>GH68</b>	<i>Bacillus subtilis</i> levansacarasa	DVWDSWP	WSGSAT	RDP	IERAN
	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> levansacarasa	WVWDTWT	WSGSSR	RDP	TERPQ
<b>GH32</b>	<i>Cichorium intybus</i> 1-exohidrolasa IIa	WMNDPNG	WSGSAT	RDP	WECPD
	<i>Thermotoga marítima</i> invertasa	WMNDPNG	FSGSAV	RDP	IECPD
	<i>Arabidopsis thaliana</i> invertasa membranal	WMNDPNG	WSGSAT	RDP	WECPD

(Lammens *et al.*, 2008)

Existen estudios que revelan que dentro del motivo 'WMNDPNG', existen dos aminoácidos críticos e importantes para desarrollar la capacidad de transfructosilación, siendo el triptófano (W) y la asparagina (N) los responsables de realizar dicha reacción. Mientras que, en el motivo 'EC', para la familia GH68 la cisteína (C) es sustituida por una arginina (R).

A pesar de sus peculiaridades estructurales de estas familias, GH32 y GH68, la asignación de una enzima particular como una  $\beta$ -FFasa o como una FTasa se basa en la relación de la actividad transferasa a hidrolasa, especialmente a bajas concentraciones de sustrato (**Tabla 5**). De hecho, solo unas pocas de estas enzimas GH tienen una actividad de transfructosilación significativamente alta para la producción de FOS.

**Tabla 5.** Características de los procesos enzimáticos para la producción de FOS

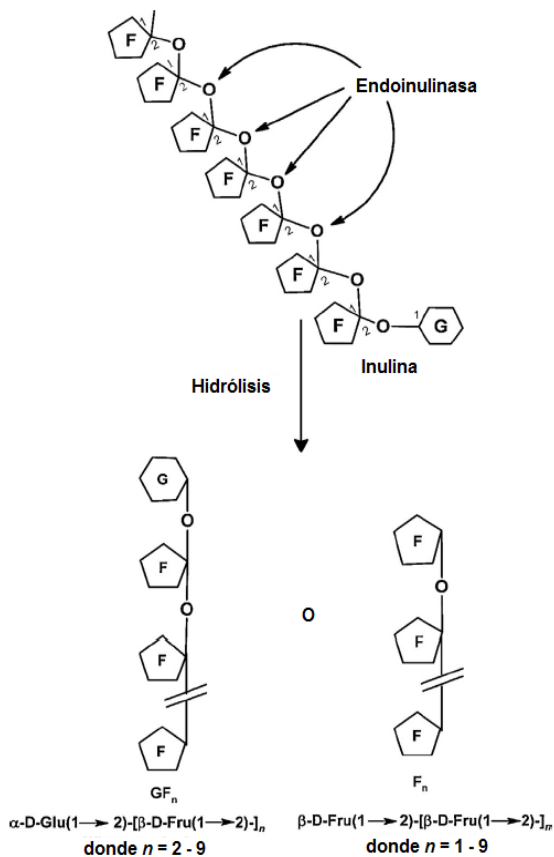
<b>Actividad Hidrolítica</b>	<b>Actividad de Transfructosilación</b>
Enzimas que la llevan a cabo son las inulinasas y levanasas, principalmente.	Enzimas que la llevan a cabo son las FTasas (levansacarasa e inulosacarasa) y $\beta$ -FFasas (invertasa, levanasa e inulinasa).
Usan fructanos (inulina) como sustrato principal	Parten de sacarosa como sustrato principal
Actividad exo y endo	No se presenta la actividad exo y endo en las FTasas e invertasa
Producción de FOS: Cadenas largas, es decir, con un grado de polimerización (DP) de 3-7 unidades de Fru	Producción de FOS: Cadenas cortas, es decir, con un grado de polimerización (DP) de 3-5 unidades de Fru

El rendimiento de los FOS producidos por la reacción termodinámica controlada depende de varios parámetros, como la concentración inicial del sustrato, el pH, la temperatura, la fuerza iónica y la composición del disolvente, asimismo del tiempo de reacción (Inthanavong, 2011; Plou *et al.*, 2007).

#### **II.4. INULINASAS**

En el caso de las inulinasas (EC 3.2.1.7), las cuales son enzimas capaces de realizar la hidrólisis de varios fructanos así como la síntesis de FOS, su actividad de transfructosilación se da principalmente a partir de la sacarosa, molécula a la cual se unen las unidades de fructosilos en la posición  $\beta$ -(2,1) de dicho disacárido (Santos & Maugeri, 2007; Silva *et al.*, 2013). Esta síntesis enzimática libera como producto de reacción a la glucosa (Risso *et al.*, 2012).

Las inulinasas son fructosilhidrolasas correspondientes a la familia GH32, las cuales se pueden obtener de diferentes microorganismos como bacterias, levaduras y hongos filamentosos (Mutanda, Wilhelmi, & Whiteley, 2008; Nemukula *et al.*, 2009).



**Figura 4.** Hidrólisis enzimática de inulina para la producción de FOS utilizando endo-inulinasas (Singh, Singh, & Kennedy, 2016)

características deseables como son la resistencia a altas temperaturas además de su eficiencia catalítica, y por lo cual pueden ser usadas en procesos industriales (Ricca *et al.*, 2007).

Por ejemplo, las levaduras son capaces de producir inulinasas que son activas en un amplio intervalo de temperaturas que van desde 35°C hasta 60°C, degradan inulinas más complejas como la agavina y, además, son secretadas al medio extracelular, lo cual facilita su proceso de purificación. Entre ellas, encontramos a *Kluyveromyces marxianus* sp., levadura que se caracteriza por presentar buenos rendimientos en la producción de inulinasas.

### II.5. *Kluyveromyces* sp.

Las levaduras, en particular, las del género *Kluyveromyces* sp. tienen un enorme potencial biotecnológico debido a sus múltiples aplicaciones tanto en la industria de alimentos como en la farmacéutica.

Por otro lado, en función a su actividad hidrolítica sobre los enlaces glicosídicos  $\beta$ -(2,1) presentes en el polifructano de la inulina, las inulinasas se clasifican como exo-inulinasas (2,1- $\beta$ -D-fructano fructohidrolasa, EC 3.2.1.80) y endo-inulinasas (2,1- $\beta$ -D-fructano-fructano fructohidrolasa, EC 3.2.1.7).

Las exo-inulinasas hidrolizan los enlaces ubicados en los extremos de dicho fructano generando como productos principales, Fru y Glc. Mientras que las endo-inulinasas realizan cortes internos, de forma aleatoria, sobre la cadena de inulina produciendo FOS de diversos tamaños y una pequeña proporción de monosacáridos (**Figura 4**).

Las inulinasas pueden obtenerse a partir de plantas y microorganismos, siendo de estos últimos, los hongos filamentosos y las levaduras de mayor interés para la producción de dichas enzimas, ya que se ha observado que éstas poseen

La especie *Kluyveromyces marxianus* es una levadura hemiascomycetosa, la cual está relacionada filogenéticamente con *Saccharomyces cerevisiae* y es hermana de la especie más conocida, *Kluyveromyces lactis* (Lachance, 2007). La principal característica común de *K. lactis* y *K. marxianus* es la capacidad de asimilar lactosa y utilizar este azúcar como fuente de carbono (Lane & Morrissey, 2010).

*Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* es una levadura de grado alimenticio que ha sido utilizada para la producción de proteína unicelular a partir del suero de leche. Además, dicho microorganismo produce varias enzimas de carácter biotecnológico como la lactasa, la pectinasa y la inulinasa, siendo esta última de mayor interés para la producción de jarabes altos en fructosa, edulcorante de bajo aporte calórico.

Dicho microorganismo tiene el estatus de GRAS (Generally Recognized As Safe, por sus siglas en inglés) haciéndolo uno de los preferidos para la producción de inulinasa con fines alimentarios y biotecnológicos. Además, tiene un gran número de características que la hacen especialmente adecuada para la aplicación industrial, como lo son tener una velocidad de crecimiento rápido, un amplio espectro de sustratos que ayuden a su desarrollo, es termotolerante ya que tiene la capacidad de crecer sobre los 52°C y una alta capacidad secretora de enzimas líticas (Lane & Morrissey, 2010).

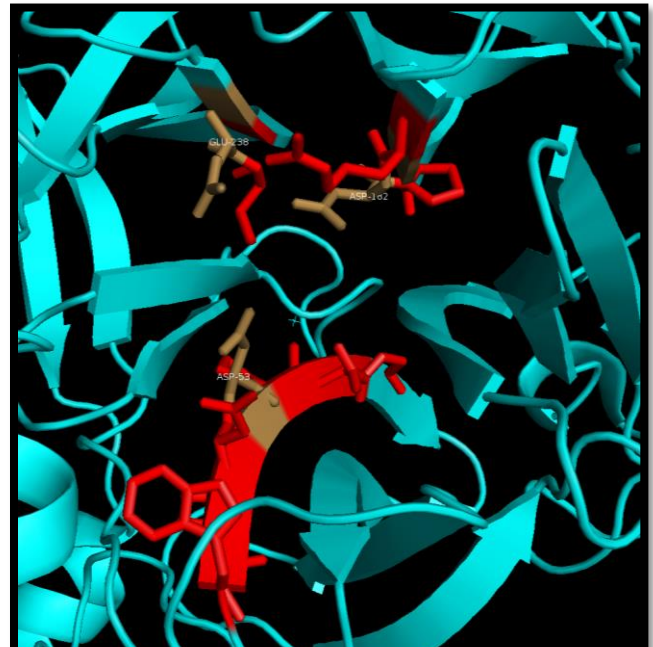
Por otra parte, las inulinasas de levaduras son enzimas extracelulares parcialmente asociadas a la pared celular y parcialmente excretadas al medio de cultivo, es decir, las inulinasas pueden presentarse como enzimas extracelulares e intracelulares (Pandey *et al.*, 1999). Sin embargo, las levaduras de dicho género producen inulinasas del tipo exo-enzimas, principalmente.

Estudios recientes han reportado la estructura tridimensional de la exo-inulinasa (INU1, **Figura 6**) que produce la cepa de *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042 (<https://www.rcsb.org/structure/6J0T>). Dicha enzima presenta una estructura dimérica, ya que está organizada por dos dominios principales. El primer dominio se encuentra en el extremo amino (N-) terminal y se compone por cinco hojas beta que forman un  $\beta$ -propela, mientras que el segundo dominio conocido como  $\beta$ -sándwich, se encuentra en el extremo carboxilo (C-) terminal y se compone de dos hojas  $\beta$  de seis hebras antiparalelas (Van den Ende *et al.*, 2009).



**Figura 5. Estructura tridimensional de la exo-inulinasa INU1 de *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042 (PDB 6J0T), donde la Cadena **A**: dominio C-terminal (color verde) y la Cadena **B**: dominio N-terminal (color azul).**

Dentro de su dominio N-terminal, se encuentran los tres residuos catalíticos, los dos aspartatos y un glutamato (**Figura 6**) ubicados en los motivos conservados de esta enzima, la cual pertenece a la familia GH32.



**Figura 6. Sitio activo del dominio  $\beta$ -propela, donde se ubica la triada catalítica. Dos aspartatos (D52, D182) y un glutamato (E238) en color ocre y los motivos conservados en color rojo.**



Por otra parte, existen evidencias que las inulinasas producidas por la levadura de *K. marxianus* sp. también pueden realizar la reacción de transfructosilación para la producción de FOS (Tabla 6), de manera similar a como lo realizan otras inulinasas aisladas de hongos filamentosos.

**Tabla 6.** Condiciones de reacción para la actividad de transfructosilación reportadas

Micro-organismo	Enzima	pH	Temperatura (°C)	Tipo de sustrato [sustrato]	RPM	Tiempo de reacción	Medio orgánico o acuoso	Disolventes	Referencia
<i>Aspergillus niger</i> (muestra comercial)	Endo-inulinasasa (4-10 U/mL)	5 Buffer de acetatos 0.1M	40	Sacarosa 1.2 M (41.1% m/v)	150	24 h	Medio orgánico bifásico: Disolvente/Buffer Relación 1:3 (v:v)	Acetato de butilo, ciclohexano, acetato de etilo, heptano, heptanona, octano, hexano	(Karboune et al., 2018)
			35						
			40						
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	Inulinasasa (5% m/v)	No señala pH Buffer de acetato 0.1 M (70% m/v)	50	Sacarosa 60% m/v	150	24 h	Medio orgánico bifásico: Disolvente/Buffer	Acetato de etilo (25% m/v)	(Silva et al., 2013)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	Inulinasasa (6 U/mL)	6 Buffer de acetatos 0.1 M	50	Sacarosa 45% m/v	SD	12 h Reactor (150 mL)	Acuoso	-----	(Santos & Maugeri, 2007)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	Inulinasasa (4 U/mL)	5 Buffer de acetatos 0.1 M	40	Sacarosa 55% m/v	150	8 h Reactor (250 mL)	Medio orgánico bifásico: Disolvente/Buffer	Acetato de butilo	(Risso et al., 2009)
		5 Buffer de acetatos 0.1 M					Acuoso	-----	
<i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 16045	Inulinasasa (4 U/mL)	5.75 Buffer de acetatos 0.1M	45	Sacarosa 55% m/v	150	9 h Reactor (150 mL)	Medio orgánico bifásico: Disolvente/Buffer	Acetato de butilo, ciclohexano, n-heptano, acetato de etilo, etanol (25 % m/v)	(Risso et al., 2010)
		6.5 Buffer de acetatos 0.1M		Sacarosa 45% m/v			Acuoso	-----	
<i>Aspergillus oryzae</i> KB	$\beta$ -Fructofuranosidasas (0.3-0.6 U)	6 Buffer de acetatos 0.5M	40	Sacarosa 50% m/v	125	24 h	Acuoso	-----	(Kurakake et al., 2010)
	F1 (actividad de transfructosilación)								
	F2 (actividad de hidrólisis)								
<i>Aspergillus</i> sp N74	Enzima inmovilizada	5 Buffer de acetatos 0.1M	60	Sacarosa >55% m/v	150	5 h	Acuoso	-----	(Sánchez et al., 2008)

### II.5.1. *Kluyveromyces marxianus* AZ8

Por otra parte, en el grupo de trabajo de la Dra. Carmina Montiel se ha llevado a cabo la caracterización y purificación de la cepa *Kluyveromyces marxianus* AZ8, aislada del bagazo de agave mezcalero, cuyas condiciones óptimas de crecimiento para la producción de inulinasa fueron estandarizadas.

Para lo cual se realizaron curvas de crecimiento con diferentes sustratos (inulina de *Agave azul*, inulina de *Agave salmiana*, inulina de achicoria, sacarosa, fructosa y glucosa), encontrándose que dicho microorganismo es capaz de utilizar como única fuente de carbono a la inulina de *Agave tequilana* *Weber* variedad *azul*. Además, se determinó que el pH de cultivo inicial óptimo es de 5 y la temperatura óptima de crecimiento es de 35°C, siendo el mejor tiempo de incubación de 72 horas con agitación moderada (200 rpm) (Raya-Chamol, 2019).

*Kluyveromyces marxianus* AZ8 produce una enzima extracelular: la inulinasa identificada como ACH1 (Raya-Chamol, 2019), la cual fue purificada mediante cromatografía por exclusión molecular, usando una columna Superdex 200S como fase estacionaria y una solución de fosfatos 50 mM adicionada con cloruro de sodio 500 mM a pH 7.2 como fase móvil, con lo cual se estimó su peso molecular (275 kDa).

Una vez pura la inulinasa ACH1, se determinó que tenía una mayor afinidad por la agavina como sustrato, debido a que fue capaz de hidrolizarla hasta fructosa, por lo cual se infirió que se trataba de una exo-inulinasa. Además, se establecieron las condiciones óptimas de esta hidrólisis, las cuales fueron: 50°C en un medio de reacción a pH 5.0, calculándose los parámetros cinéticos de la hidrólisis de agavina, teniendo la exo-inulinasa ACH1 una  $K_m$  de  $4.00 \pm 1.085$  mM, una  $V_{m\acute{a}x}$  de  $600 \pm 85$  U/mg y una  $K_{cat}$  de  $2.738$  s<sup>-1</sup> (Guerrero-Corona, 2019).

Como se puede apreciar la inulinasa ACH1 de *K. marxianus* AZ8 tiene la capacidad nativa de hidrolizar al fructano de la agavina. Considerando que otras inulinasas tienen la capacidad de realizar la reacción de transfructosilación, en el presente trabajo se pretende evaluar si esta propiedad es compartida por la ACH1, para lo cual se evaluarán diferentes condiciones de reacción como son la concentración del sustrato, la temperatura y el pH, y esto resulte en la producción de FOS.

### **III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **HIPÓTESIS**

La reacción de transfructosilación de sacarosa catalizada por la exo-inulinasa ACH1 de *Kluyveromyces marxianus* AZ8 se verá favorecida si se modifican las condiciones de reacción como concentración de sustrato, temperatura y pH.

#### **OBJETIVO GENERAL**

Establecer las mejores condiciones de reacción para la producción de FOS mediante la reacción de transfructosilación catalizada por la exo-inulinasa ACH1 de *Kluyveromyces marxianus* AZ8.

#### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Estudiar el efecto de la concentración de sacarosa sobre la actividad de transfructosilación de la exo-inulinasa ACH1.
- Estudiar el efecto de la temperatura y pH de reacción sobre la actividad de transfructosilación de la exo-inulinasa ACH1.
- Comprobar la actividad de transfructosilación de la exo-inulinasa ACH1 para la producción de FOS.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### IV.1. Producción de la exo-inulinasa ACH1 a partir de *Kluyveromyces marxianus* AZ8

#### IV.1.1. Crecimiento de la cepa

Inicialmente, se preparó un preinóculo estéril de 5 mL de medio mínimo (**Tabla 7**) en un tubo de ensaye. Bajo condiciones asépticas, se inoculó en el medio un volumen de 10  $\mu$ L de la cepa pura de *Kluyveromyces marxianus* AZ8, previamente descongelada (ultracongelador REVCO, Value Chest Freezer Thermo Scientific). Posteriormente, el preinóculo se incubó (New Brunswick Innova 4330 Refrigerated Incubator Shaker. Serial# 8907155) a una temperatura de 35°C a 120 revoluciones por minuto (rpm) durante un tiempo de 24 horas (h).

**Tabla 7.** Tabla de formulación de medio mínimo

FORMULACIÓN	
Componente	Cantidad (% m/v)
Inulina de agave <i>tequilana weber</i> var. azul	0.5
Extracto de levadura	0.2
Sulfato de amonio	0.1
Cloruro de potasio	0.05
Fosfato monobásico de sodio monoclorado	0.1
<b>Agar bacteriológico**</b>	1.5

\*\*Uso únicamente para medio sólido en placa

#### IV.1.2. Verificación de la pureza del medio

Transcurridas las 24 h de incubación, se realizó una tinción simple al preinóculo con safranina, la cual se observó al microscopio óptico (Olympus B201) con el objetivo 100X, con el fin de verificar que no se encontrara la presencia de microorganismos contaminantes como cocos o bacilos. Una vez comprobada la pureza microscópicamente de la cepa, se procedió a escalar el preinóculo en un medio mínimo estéril de 500 mL a condiciones de incubación de 35°C a 200 rpm por 72 h.

Dado que la exo-inulinasa de dicha cepa es una enzima extracelular, se realizó la centrifugación (Pro-Research, Centurion Scientific Lid) del medio mínimo a 9500 rpm por 12 minutos (min) a 4°C para la obtención del sobrenadante (**extracto crudo**), el cual fue decantado en vasos de plásticos rotulados y colocados en el ultracongelador a -81°C por 24 h. Posteriormente, las muestras congeladas se

colocaron en la liofilizadora (Heto CT60E Cooling Trap) por 48 h, se pesó el liofilizado obtenido en una balanza analítica (Ohaus® AP250D Analytical Plus balance). Después, este sólido se resuspendió en una solución amortiguadora de acetatos 50 mM a pH 5 y se filtró a través de filtros de membrana de 0.45 µm.

## IV.2. Evaluación de la actividad enzimática y determinación de proteína

Cabe señalar que entre cada etapa experimental: extracto crudo, liofilización y purificación de la exo-inulinasa ACH1 de *K. marxianus* AZ8, se realizó la cuantificación de proteína usando el método de Bradford, así como la determinación del consumo de sustrato a través del método cuantitativo de azúcares reductores (Miller, 1959) que a continuación se describen respectivamente:

### IV.2.1. Método de Bradford

Se realizó una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) a partir de una solución estándar de 0.1 mg BSA/mL. Dependiendo de cada muestra experimental, se colocaron en tubos de microcentrifuga de 2 mL, alícuotas entre 10 y 100 µL, las cuales fueron llevadas a un volumen de 800 µL completando con agua desionizada para finalmente añadir los 200 µL del reactivo de Bradford. Dichas muestras se dejaron reaccionar por 5 min, junto con su respectivo control y se homogeneizaron en un vórtex para su posterior lectura en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific) a una absorbancia de 595 nanómetros (nm).

Partiendo de la ecuación de la recta correspondiente a la curva patrón se calculó la concentración de proteína en cada muestra experimental. Este resultado se expresó como miligramos de proteína por mililitro (mg de proteína/mL).

### IV.2.2. Determinación de la actividad hidrolítica de la enzima (extracto crudo, extracto liofilizado, enzima pura)

Se determinó la actividad hidrolítica del extracto crudo, extracto liofilizado y de la enzima pura.

La reacción enzimática se llevó a cabo empleando como sustrato una solución de inulina de agave (agavina) al 1% (m/v) en solución amortiguadora de acetatos 50 mM a pH 5.

En un tubo de microcentrifuga de 2 mL, se colocó un volumen de agavina al 1% y se completó a un mililitro de volumen total, de acuerdo a como se indica en la **Tabla 8.**

**Tabla 8.** Volúmenes utilizados y tiempo de incubación para las diferentes muestras

Muestra	Volumen de muestra (µL)	Volumen de sustrato (Agavina al 1 % m/v) (µL)	Volumen final (µL)	Tiempo de incubación (min)
<b>Extracto crudo</b>	500	500	1000	120
<b>Extracto liofilizado</b>	30	970	1000	20
<b>Enzima pura</b>	30	970	1000	20

**Tabla 8.1.** Volúmenes utilizados para los controles de reacción enzimática

Controles	Volumen de muestra	Volumen de sustrato (Agavina al 1 % m/v)	Volumen de solución amortiguadora	Agua desionizada
<b>Control 1</b> extracto crudo	500 µL	---	500 µL	---
<b>Control 2</b> extracto crudo	---	500 µL	---	500 µL
<b>Control 1</b> extracto liofilizado	30 µL	---	970 µL	---
<b>Control 2</b> extracto liofilizado	---	970 µL	---	30 µL
<b>Control 1</b> enzima pura	30 µL	---	970 µL	---
<b>Control 2</b> enzima pura	---	970 µL	---	30 µL

La reacción se incubó a una temperatura de 50°C y 500 rpm de acuerdo con el tiempo indicado en la **Tabla 8**. Posteriormente, se detuvo la reacción a través de un choque térmico utilizando un baño caliente a 95°C por 5 minutos.

A la par del ensayo, se realizaron dos controles negativos bajo las mismas condiciones de reacción; en uno se usó la solución de agavina al 1% (m/v) resuspendido en el amortiguador de acetatos 50 mM a pH 5 y agua desionizada, mientras que en el otro se añadió solo la muestra y la solución amortiguadora de acetatos de 50 mM a pH 5. En la **Tabla 8.1**. se indican los volúmenes respectivos.

Consecutivamente, se colocó en tubos de ensaye de 5 mL, un volumen de 100 µL de cada ensayo enzimático, a los cuales se les añadió 200 µL de amortiguador de acetatos 50 mM a pH 5 y 600 µL de reactivo DNS, respectivamente. Los reactivos se mezclaron y los tubos se colocaron en un baño de glicerina (RTC basic safety control, IKA: ETS-D4 fuzzy, IKA) a 95°C por 5 min. Posteriormente, se hizo un

choque térmico con hielo durante 20 min para detener la reacción, después se agregaron 4 mL de agua destilada y se homogeneizó para continuar con la lectura espectrofotométrica, a una absorbancia de 540 nm frente a un blanco de reactivos.

Partiendo de la ecuación de la recta correspondiente a la curva patrón que se realizó con fructosa. Se determinó la cantidad de azúcares reductores en cada muestra experimental. Este resultado se expresó como micromoles de fructosa por mililitro ( $\mu\text{mol}$  de Fru/mL).

Por otro lado, la determinación de la actividad enzimática se realizó en función del ensayo de azúcares reductores anteriormente descrita, cuyo resultado se reportó como U/mL, donde la U es igual a un  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Fru por min de reacción.

### **IV.3. Purificación de la exo-inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* AZ8**

#### **IV.3.1. Cromatografía por exclusión molecular**

El sólido obtenido de la liofilización del extracto crudo, se resuspendió en una solución amortiguadora de acetatos 50 mM a pH 5 y se filtró. Se prosiguió con el proceso de purificación de la enzima a través del uso del equipo Fast Performance Liquid Chromatography, (por sus siglas en inglés, FPLC; ÄKTA Purifier, General Electric).

Para ello, se empleó la técnica de cromatografía por exclusión molecular utilizando una columna Superdex 200S 10/300 de 24 mL de volumen, con intervalo de 10-600 kDa, cuyas condiciones de trabajo fueron fase móvil: solución amortiguadora de fosfatos 50 mM adicionada con cloruro de sodio (NaCl) 500 mM a pH 7.2, temperatura ambiente y flujo 0.5 mL/min, con una presión constante de 0.75 MPa en la columna.

Es importante señalar que la columna Superdex 200S fue empacada en el laboratorio 314, usando un flujo máximo de 7 mL/min de etanol al 20% (v/v) y una presión máxima de 1.5 MPa (megaPascal). Posteriormente, la columna se lavó con agua desionizada, seguido de una solución amortiguadora de fosfatos 50 mM a pH 7.2 con azul de dextrano para verificar su correcto empaquetamiento.

##### ***IV.3.1.1. Determinación del peso molecular de la enzima***

La columna Superdex 200S se calibró utilizando un kit de estándares (Bio-Rad, Gel Filtration Standard #1511901). Este kit comercial contiene una mezcla de proteínas como vitamina B12, mioglobina de equino, ovoalbúmina de gallina,  $\gamma$ -globulina

bovina y tiroglobulina bovina, cuyos pesos moleculares son 1.35, 17, 44, 158 y 670 kDa, respectivamente. Mientras que para determinar el volumen muerto de la columna se utilizó azul de dextrano.

Se mezcló una alícuota de 0.1 g del kit de calibración en 500 µL de amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 7.2, la cual se inyectó a la columna a un flujo de 0.5 mL/min. De la misma forma, se procedió con el azul de dextrano. Se obtuvieron los volúmenes de elución (mL) de cada estándar y del azul de dextrano para calcular el factor  $K_a$ , el cual se expresa como:

$$K_a = \frac{(\text{Volumen muestra estándar} - \text{Volumen muerto})}{(\text{Volumen total} - \text{Volumen muerto})}$$

Es decir, dicho factor es la relación del volumen de elución de la muestra estándar, el volumen muerto del azul de dextrano y el volumen total de la columna Superdex 200S (24 mL). Para cada estándar, se determinó el factor  $K_a$ , cuyos valores se graficaron con sus respectivos pesos moleculares, en Daltons (Da), en forma logarítmica con el fin de obtener la ecuación de la recta (**Anexo I**). A partir de ella, se calculó el peso molecular, en kDa, de la muestra experimental una vez que ésta se eluyó y se obtuvo su volumen de elución.

#### **IV.3.2. Monitoreo del proceso de purificación de la inulinasa ACH1**

Entre cada corrida, se recolectaron las fracciones de interés, a las cuales se les evaluó su actividad enzimática y cantidad de proteína con los métodos previamente descritos. El objetivo fue verificar que la muestra experimental señalada por el sistema presentara actividad inulinolítica, es decir, identificar la presencia de la enzima pura en dicha fracción.

##### ***IV.3.2.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE)***

Una vez, corroborada la actividad inulinolítica de la enzima pura, se procedió a realizar la electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés). Para ello, se preparó un gel vertical de dos fases, un gel inferior o separador y un gel superior o concentrador. En la **Tabla 9**, se resumen los reactivos utilizados para su correspondiente elaboración:



**Tabla 9.** Composición química para la preparación del gel de electroforesis SDS-PAGE.

	Gel inferior	Gel superior
Reactivop	Cantidad (µL)	Cantidad (µL)
Acrilamida/Bis-acrilamida 30% / 0.8% m/v	3330	670
Amortiguador de concentración 0.5 M de Tris-HCl a pH 6.8	2500	----
Amortiguador de separación 1.5 M de Tris-HCl a pH 8.8	----	1250
Dodecil sulfato de sodio SDS 10%	100	50
Agua desionizada	4000	3000
Persulfato de amonio 10%	100	100
Tetrametiletilendiamina (TEMED)	13	13

Primero, en un vaso de precipitados de 50 mL, se mezclaron los reactivos para la preparación del gel inferior; la mezcla resultante se adicionó, con ayuda de una micropipeta de 5 mL, al interior de los moldes de vidrio (Bio-Rad Mini-PROTEAN), previamente montados en los casetes de marco, hasta alcanzar tres cuartas partes del volumen. Se agregó 1 mL de isobutanol para tener una capa del gel de forma uniforme, evitando la formación de burbujas de aire o meniscos. Se dejó polimerizar el gel al menos por 10 min y el isobutanol agregado se secó con papel filtro.

Segundo, de forma similar, se procedió a la elaboración del gel superior. La mezcla de éste se adicionó entre los moldes de vidrio, en seguida, se colocó el peine de separación, encargado de formar los pocillos del gel, sin atrapar burbujas de aire y se dejó gelificar por al menos 10 minutos. Una vez polimerizado, el gel de acrilamida se colocó en el gel cassette (soporte con electrodos), para después introducirlo a la cámara de electroforesis para proteínas (Bio-Rad Mini-PRTOEAN Tetra Cell). Se retiró el peine de separación, deslizándolo suavemente hacia arriba y se llenó la cámara electroforética con solución amortiguadora de corrida 1X, cuya composición fue 25 mM de Tris, 192 mM de glicina y 0.1% de SDS (Laemmli, 1970).

La preparación de las muestras, obtenidas de la purificación cromatográfica, se realizó con base en las cantidades obtenidas, previamente dializadas y concentradas por liofilización. Las muestras se prepararon al disolverlas en una mezcla 1:1 de agua desionizada y amortiguador de tratamiento (buffer de carga, 0.125 M de Tris-HCl a pH 6.8; 4% de SDS; 2% de  $\beta$ -mercaptoetanol; 0.02% de azul de bromofenol y 20% de glicerol). Las muestras homogenizaron por agitación en

vórtex y se colocaron en un baño de glicerina a 95°C por 5 min para desnaturalizar la proteína contenida en ellas.

Las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se colocaron en el gel de acrilamida con ayuda de una micropipeta (Gilson™ F167300) de 10 µL. En el primer pozo, se cargó un volumen de 5 µL del marcador de peso molecular (Bio-Rad Precision Plus Protein™ Standars #161-0374) y en los pozos posteriores, se cargaron volúmenes de 40 µL (50 µg proteína/mL) de las muestras previamente tratadas, respectivamente.

En un inicio, a la electroforesis se le aplicó un voltaje de 75 V, mas una vez que las proteínas migraron hacia el gel separador, éste se incrementó a 100 V. Este proceso duró un tiempo de 2 h aproximadamente. La corrida electroforética se detuvo cuando el frente salió por completo del gel, éste se desmontó del gel cassette y cuidadosamente, se retiró el gel de los moldes de vidrio, el cual se lavó con agua corriente y se depositó en un recipiente de plástico, descartando el gel concentrador y dejando el gel separador para la tinción con azul de Coomassie.

#### ***IV.3.2.1.1. Tinción de Azul de Coomassie (CBB) del gel de electroforesis SDS-PAGE***

El proceso de revelado del gel de electroforesis SDS-PAGE se realizó por medio de la tinción de azul de Coomassie (Burgess & Deutscher, 2009), la cual consiste en una serie de lavados con disolventes orgánicos a diferentes tiempos y con agitación moderada.

Primero, el gel se fijó a través de la preparación de una solución de metanol al 50% (v/v) en un lavado de 20 min. Posteriormente, se enjuagó con agua desionizada por 15 min. A continuación, se agregó la solución para tinción de azul de Coomassie procurando que el gel quedara totalmente sumergido, agitándose durante 30 min. Finalmente, se destiñó el gel con una solución de agua desionizada-metanol-ácido acético en una relación 50:50:1, respectivamente, dejando en agitación de 1 a 2 h de enjuague hasta que se observó un fondo limpio y transparente.

Para la tinción con azul de Coomassie se utilizó una solución de tinción, cuya composición fue 50% metanol, 10% ácido acético glacial, 40% agua destilada y 0.05% (m/v) de azul de Coomassie. Es recomendable que siempre esté tapada dicha solución por los olores que emanan de la misma.

#### ***IV.3.2.1.2. Tinción de Schiff (Glicosilación)***

Posteriormente, se realizó la tinción de Schiff, cuyo objetivo es identificar la presencia de carbohidratos en la enzima pura. Para ello, se partió de un gel de electroforesis SDS-PAGE previamente teñido y lavado, al cual se le realizó un lavado con la solución de ácido peryódico al 1% (m/v) dejándose en agitación por 60 min. A continuación, se enjuagó dos veces el gel con agua desionizada durante 20 min cada vez. En seguida, se adicionó al gel el reactivo de Schiff hasta observar el cambio de coloración en las bandas del gel a un color magenta. Finalmente, se le añadió una solución de metabisulfito al 0.5% y se colocó en agitación por 2 h. El gel se destiñó con diversos lavados de agua desionizada. Para esta técnica, se usó como control positivo a la proteína peroxidasa de rábano, la cual presenta glicosilaciones y como control negativo a la albúmina bovina.

#### ***IV.3.2.1.3. Identificación de los productos de reacción por Cromatografía de capa fina (CCF)***

Los productos de la hidrólisis enzimática de la agavina se monitorearon a través del uso de cromatografía por capa fina analítica (CCF). Se aplicaron 0.5 µL de las muestras experimentales en las placas de aluminio con gel de sílice (Merck TLC Plates-Silica Gel 60 F<sub>254</sub>) de 5 X 10 cm. Por otro lado, se empleó como fase móvil (eluyente) una solución de *n*-butanol:metanol:agua (3:2:1). Las cromatoplasas se colocaron en una cámara de elución durante 1 h y, posteriormente, se revelaron con una solución de ácido sulfúrico al 5% (v/v) en etanol absoluto, adicionando 10 mg de orcinol por mililitro de esta solución. La solución reveladora se aplicó por nebulización sobre la cromatoplasa y ésta se calentó a 90°C en una parrilla eléctrica hasta aparición de las manchas.

### **IV.4. Determinación de la actividad de transfructosilación de la *exo*-inulinasa ACH1 de *Kluyveromyces marxianus* AZ8**

#### **IV.4.1. Ensayos enzimáticos de transfructosilación**

A partir de la obtención de la enzima pura, se propuso realizar microensayos de transfructosilación partiendo de la sacarosa como sustrato principal. Se evaluaron diferentes condiciones de reacción como concentración de sacarosa, temperatura y pH, así como el tiempo de reacción óptimo y la actividad enzimática para la obtención de FOS.

Para llevar a cabo los microensayos enzimáticos, se tomaron como parámetros iniciales las condiciones óptimas de la reacción de hidrólisis enzimática, las cuales

fueron un medio de sacarosa a pH 5 con agitación a 500 rpm, incubación a 50°C, y tiempos de reacción de 20 min hasta 24 h.

#### ***IV.4.1.1. Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad de transfructosilación***

Se pesaron 5 mg de enzima, los cuales se resuspendieron en 437  $\mu$ L de solución amortiguadora de acetatos o fosfatos 50 mM a diferentes valores de pH, se trabajó en un intervalo de pH 3 a 8. Las soluciones amortiguadoras que se emplearon de pH 3 a pH 5 fue una solución de acetatos 50 mM, mientras que de pH 6 a pH 8 se usó una solución de fosfatos a 50 mM. Se tomó una alícuota de 218  $\mu$ L de dicha solución, los cuales se resuspendieron en 282  $\mu$ L de sacarosa al 80% (m/v) con el fin de obtener un volumen final de 500  $\mu$ L y una concentración final de sacarosa al 45% (m/v).

Una vez, determinado el valor de pH óptimo para la reacción de transfructosilación, se prosiguió a montar los mismos microensayos, pero ahora, variando la temperatura de reacción, la cual se trabajó de 30, 40, 50, 55, 60 y 70°C. Cada ensayo enzimático se detuvo colocando las muestras a 95°C por 5 min para su posterior análisis cromatográfico cualitativo, HPAEC-PAD (ver adelante).

Los productos de cada ensayo de transfructosilación se observaron por la técnica de CCF, en el cual se corrieron las muestras experimentales con sus respectivos controles de sustrato (sacarosa a determinado % m/v), productos finales (FOS, Fru y Glc) y la enzima pura.

#### ***IV.4.2. Cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD)***

Esta técnica de análisis consiste en cuantificar los azúcares mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) usando como controlador del sistema el Waters 600E. Dicho equipo cuenta con un detector de índice de refracción (Waters 410) y utiliza una columna ES de carbohidratos Prevail (250 x 4.6 mm) a 30°C.

El sistema de HPLC se estabilizó con una fase móvil que consiste en una mezcla 75:25 (v/v) de acetonitrilo y agua desionizado a un flujo de 1.0 mL/min durante 24 h. Posteriormente, se utilizó un gradiente de elución, donde la corrida inició al tiempo 0 min con el eluyente A al 100% (NaOH 150 mM); al 0.5 min solución A al 99%; a los 25 min se usó solución A al 80%; al minuto 85 se usó solución A al 20% y al minuto 95 el eluyente B al 100%. El eluyente B también era NaOH a 150 mM, pero en solución amortiguadora de acetato de sodio a 500 mM.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### V.1. Obtención y purificación de la exo-inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* AZ8

Con base en los métodos previamente descritos, se produjo y aisló la enzima inulinasa ACH1 de *K. marxianus* AZ8. Para ello, se comenzó con un volumen de 488 mL del sobrenadante (extracto crudo) obtenido del crecimiento celular de la levadura. Posteriormente, éste se liofilizó para concentrarlo en un sólido con una concentración de 0.0104 mg de proteína por mililitro.

Se continuó con el paso de cromatografía por exclusión molecular, en donde se recuperaron 6 mL de enzima con una cantidad de 0.054 mg de proteína total. Finalmente, se llevó a cabo la diálisis para retirar las sales de la muestra pura y concentrar nuevamente en un sólido, con el cual se realizaron los microensayos de transfructosilación a diferentes condiciones de reacción como pH, temperatura, % de sacarosa, entre otros.

En la **Tabla 10**, se observa que dicha técnica cromatográfica como único paso de purificación obtuvo un rendimiento del 76% y se purificó 27 veces, así como en su actividad específica total, 3983.14 U/mg proteína.

**Tabla 10.** Tabla de purificación de la inulinasa ACH1 de *Kluyveromyces marxianus* AZ8

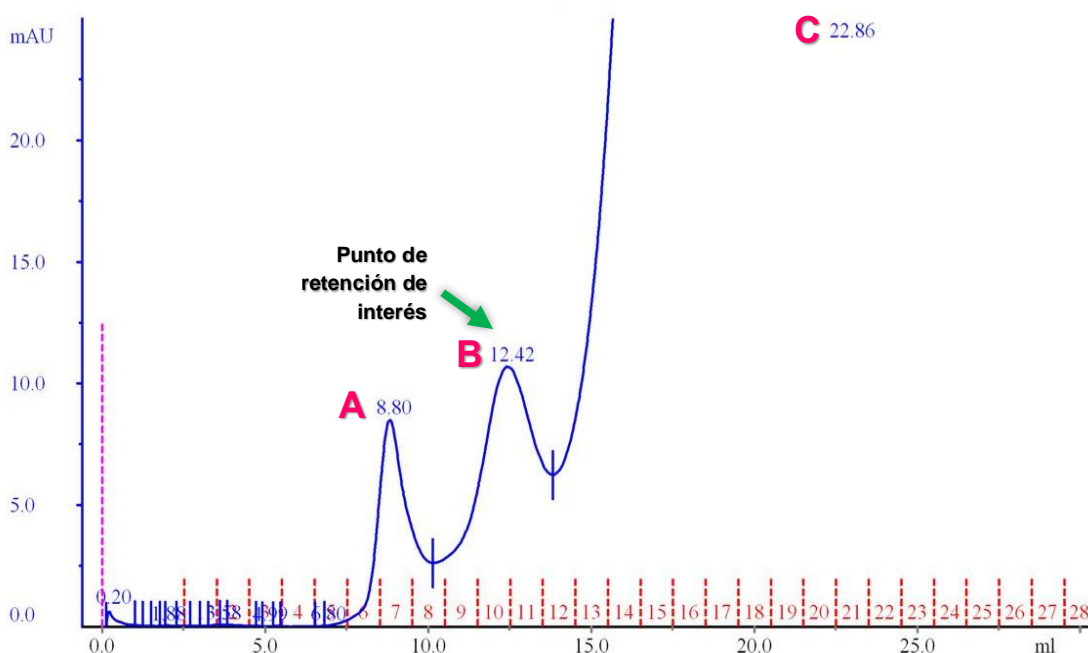
ETAPA	Volumen total (mL)	Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	Actividad volumétrica ( $\mu\text{mol}/\text{min}^* \text{mL}$ )	Actividad total (U)	Actividad específica total (U/mg proteína)	Rendimiento (%)	Veces de purificación
Extracto crudo	488.00	0.004	1.952	0.58	283.04	145.14	100	1
Exclusión molecular Superdex 200S	6.0	0.009	0.054	35.85	215.09	3983.14	76	27

### V.1.1. Purificación de la exoinulinasa usando cromatografía de exclusión molecular

Para llevar a cabo la purificación de la enzima de interés, se utilizó una columna Superdex 200S 10/300 de un volumen de 24 mL. Como fase móvil se usó una solución amortiguadora de fosfatos 50 mM a un pH de 7.2 adicionado con una solución 500 mM de cloruro de sodio (NaCl).

Esta técnica cromatográfica sólido-líquido contiene como fase estacionaria un gel, cuya matriz está constituida por agarosa/dextranos entrecruzados. El fundamento de esta técnica es la separación de proteínas en función a su tamaño de partícula y masa molecular, es decir, las proteínas de mayor masa molecular eluyen primero, mientras que las de menor masa molecular se retienen en el gel.

Una vez que se inyectó 0.5 mL de la muestra liofilizada (10 µg proteína/mL), previamente filtrada, en el FPLC, se obtuvo como resultado el cromatograma de la **Figura 7**:



**Figura 7. Cromatograma de exclusión molecular en la columna Superdex 200S.** Se utilizó una solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M a pH 7.2 adicionado con NaCl 0.5 M a un flujo de 0.5 mL/min. Donde la línea azul (—) corresponde a la señal de absorbancia UV, la línea roja punteada (- - -) al número de fracción y la línea punteada magenta (- - -) al punto de inyección de la muestra.

Partiendo del cromatograma de la **Figura 7**, donde el eje de las abscisas corresponde a la señal de absorbancia medida en mili-absorbancia UV (mAU) y el eje de las ordenadas representa el volumen de elución medido en mL y los números marcados en rojo indican el número del tubo de ensaye en la que se colectó la fracción para su posterior estudio.

Las fracciones de los picos se marcaron como **A**, **B** y **C** en el cromatograma de la **Figura 7**, cuyos valores marcados en azul representan el volumen al cual eluyeron las proteínas que fueron 8.80, 12.42 y 22.86 mL, respectivamente. A estas fracciones se les determinó la actividad enzimática y los azúcares reductores producidos a través del método de DNS, con el propósito de identificar en cuál de ellas se encontraba la enzima de estudio.

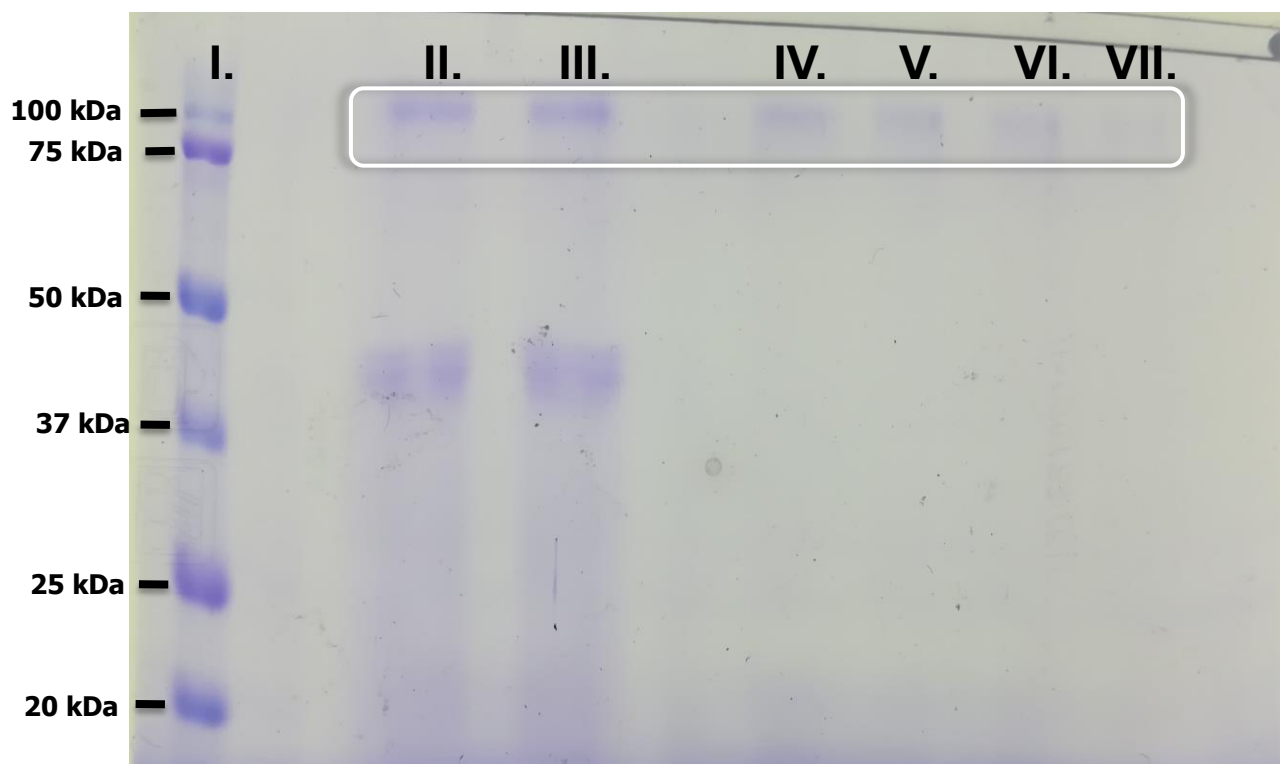
Las fracciones 10 y 11, que componen el pico marcado como **B**, presentaron actividad de inulinasa utilizando agavina (1% m/v) como sustrato y su peso molecular fue de 288 kDa (**Método IV.3.1.1.**), aproximadamente. Se dedujo que la fracciones 10 y 11 corresponden a la inulinasa ACH1. En las fracciones 7 y 20 no se observó actividad inulinolítica alguna.

### **V.1.2. Electroforesis SDS-PAGE del proceso de purificación por exclusión molecular**

Para monitorear la pureza de la enzima en cada etapa de la purificación, se realizó un gel de electroforesis SDS-PAGE, en el cual se corrieron las muestras obtenidas antes y durante dicho proceso cromatográfico.

Se reveló el gel de poliacrilamida desnaturalizante con azul de Coomassie, en el cual se observó, en los carriles **II.** y **III.** correspondientes a la muestra del extracto liofilizado, la presencia de dos bandas de proteínas extracelulares de diferente tamaño molecular (**Figura 8**). La primera banda se ubica entre los marcadores de 37 y 50 kDa, mientras que la segunda banda oscila entre los 100 y 150 kDa.

En los carriles del **IV.** al **VII.** se introdujo la muestra obtenida de la exclusión molecular, a diferentes volúmenes de carga. En estos carriles, se observa la presencia de una sola banda que comprende por arriba de los 100 y debajo de los 150 kDa (**Figura 8**), la cual coincide con la banda observada en la muestra liofilizada del extracto crudo. Es decir, la inulinasa de *K. marxianus* AZ8 se obtuvo pura por dicha técnica.



**Figura 8. Electroforesis SDS-PAGE.** Gel de poliacrilamida 10% teñido con azul de Coomassie del proceso de purificación corrido a 100 V. Carriles: **I.** Marcador de peso molecular, kDa (5  $\mu$ L); **II.** Muestra liofilizada (40  $\mu$ L); **III.** Muestra liofilizada (30  $\mu$ L); **IV.** Muestra pura (40  $\mu$ L); **V.** Muestra pura (30  $\mu$ L); **VI.** Muestra purificada (20  $\mu$ L); **VII.** Muestra pura (10  $\mu$ L).

El análisis SDS-PAGE es una técnica molecular que desnaturaliza proteínas y permite evaluar el peso molecular, así como la pureza de una enzima. En este gel, en el cual se observó que el tamaño del monómero de la enzima pura oscilaba entre los marcadores de 100 y 150 kDa. Este dato, aunado al peso molecular de 288 kDa determinado mediante exclusión molecular, permite afirmar que la enzima tiene una estructura dimérica.

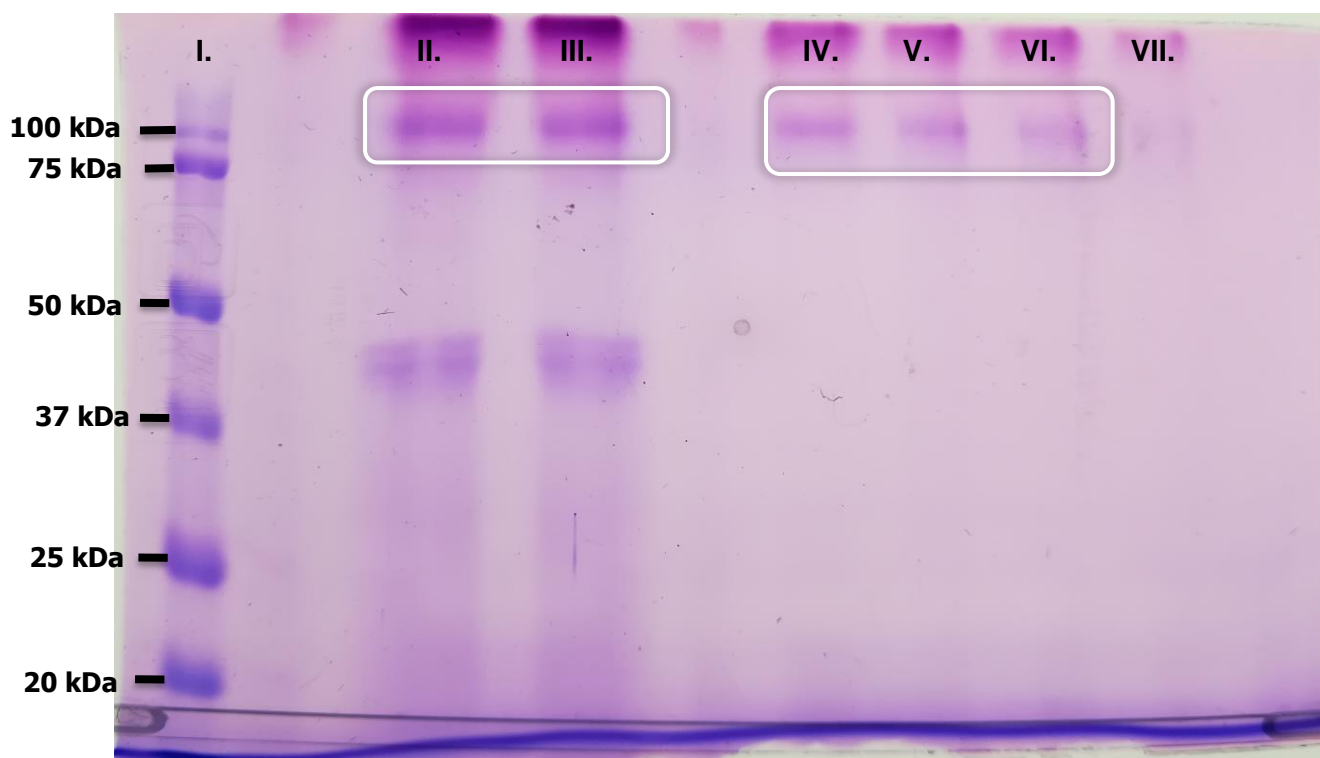
### V.1.3. Determinación de la glicosilación en la inulinasa por medio de la tinción de Schiff

A su vez, se realizó la tinción con Ácido Peryódico-Schiff (PAS, por sus siglas en inglés) para detectar posibles glicosilaciones asociadas a la inulinasa producida por *K. marxianus* AZ8.

Esta técnica cualitativa consiste en oxidar los carbohidratos presentes con una solución de ácido peryódico al 1% (m/v), es decir, los enlaces carbono-carbono de estas hexosas se rompen formando grupos aldehído, los cuales en presencia del reactivo de Schiff (ácido sulfuroso con fucsina) dan como resultado una coloración magenta (Matthieu & Quarles, 1973).



Tal como se observa en el gel SDS-PAGE de la **Figura 9**, la presencia de estas moléculas se visualiza como bandas de color magenta con un fondo incoloro o rosado débil. Por lo tanto, la inulinasa ACH1 pura se encuentra glicosilada, es decir, está adicionada con carbohidratos y, por ello, recibe el nombre de glicoproteína.



**Figura 9. Tinción de Schiff.** Gel de poliacrilamida 10% teñido con reactivo de Schiff. Carriles: **I.** Marcador de peso molecular, kDa (5  $\mu$ L); **II.** Muestra liofilizada (40  $\mu$ L); **III.** Muestra liofilizada (30  $\mu$ L); **IV.** Muestra purificada (40  $\mu$ L); **V.** Muestra pura (30  $\mu$ L); **VI.** Muestra pura (20  $\mu$ L); **VII.** Muestra pura (10  $\mu$ L).

Con base en los resultados obtenidos del proceso de purificación, se puede inferir que la inulinasa ACH1 pura de *K. marxianus* AZ8 es una glicoproteína dimérica.

Para el caso de las enzimas inulinasas provenientes de la levadura de *K. marxianus* sp., algunos estudios reportan que su peso molecular puede ir de los 28 a los 450 kDa (Holyavka, Artyukhov, & Kovaleva, 2016). Por ejemplo, la cepa de *K. marxianus* Y-85 produce tres formas de inulinasas con pesos moleculares de 42, 65 y 57 kDa, respectivamente. Mientras que la enzima producida por *K. marxianus* DSM 70106 ha demostrado ser un dímero de 200 kDa (Ku & Hang, 1994; Pessoa Jr & Vitolo, 1997; Wei *et al.*, 1998).

En la **Tabla 11**, se puede apreciar que la inulinasa de *K. marxianus* AZ8 es una proteína de mayor tamaño comparada con las ya reportadas en la literatura. Esta diferencia de tamaño puede atribuirse al grado de glicosilación que presenta la enzima ACH1.

**Tabla 11.** Pesos moleculares de inulinasas extracelulares provenientes de *Kluyveromyces marxianus* sp.

Cepa de <i>K. marxianus</i>	Técnica molecular	Peso molecular (kDa)	Estados de agregación	Referencia
<i>K. marxianus</i> var. Bulgaricus ATCC16045	FPLC	77	ND	(Kushi, Monti, & Contiero, 2000; Pessoa Jr & Vitolo, 1997)
	SDS-PAGE	57		
<i>K. marxianus</i> CBS 6556	FPLC	165–180	Dímero	(Rouwenhorst <i>et al.</i> , 1990)
	SDS-PAGE	87–102		
<i>K. marxianus</i> Y-303	FPLC	63	Dímero	(Artyukhov <i>et al.</i> , 2009)
	SDS-PAGE	55 y 8		
<i>K. marxianus</i> ISO3	FPLC	250-256	Dímero	(Trapala <i>et al.</i> , 2020)
<i>K. marxianus</i> AZ8	FPLC	≈288	Dímero	Este trabajo
	SDS-PAGE	≈144		

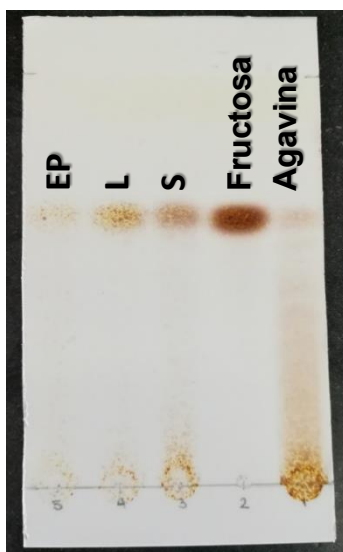
Rouwenhorst y col en 1990, realizando un estudio SDS-PAGE, reportaron que existen dos formas de inulinasas: una extracelular y una intramembranal, producidas por la cepa de *K. marxianus* CBP 6556, en el estudio se observó una banda polidispersa con un peso molecular entre 87 y 102 kDa debido a los diferentes grados de glicosilación de cada enzima. Una vez que dichas inulinasas fueron procesadas con la endo- $\beta$ -*N*-acetilglucosaminidasa H (E.C. 3.2.1.96), enzima encargada de separar los carbohidratos del glóbulo proteínico, el peso molecular de éstas disminuyó a 72 kDa. Por lo tanto, Rouwenhorst *et al.* (1990) concluyeron que la exo-inulinasa de *K. marxianus* CBP 6556 es un dímero con un peso molecular que varía de 165 a 180 kDa, y la inulinasa unida a la pared celular es un tetrámero con un peso molecular que varía de 335 a 450 kDa.

En ambos casos, la subunidad es un polipéptido con un peso molecular de 64 kDa y un grado de glicosilación que varía del 26 al 37%. Ambas formas de inulinasas eran estables y no se convertían entre sí, a menos que estuvieran influenciadas por factores externos. Curiosamente, el dímero era más activo con la inulina, en comparación del tetrámero.

#### V.1.4. Reacción de hidrólisis enzimática, análisis por cromatografía en capa fina

Una vez concluido con el proceso de purificación, los productos obtenidos de la reacción de hidrólisis enzimática en cada etapa se monitorearon a través de la técnica cualitativa de cromatografía en capa fina analítica (CCF) como se observa en la **Figura 10**.

En dicha técnica se empleó como medio de elución una mezcla de *n*-butanol: metanol:agua (5:3:2), respectivamente. Las muestras se revelaron con una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5% (v/v) en etanol adicionado con orcinol a 10 mg/mL.



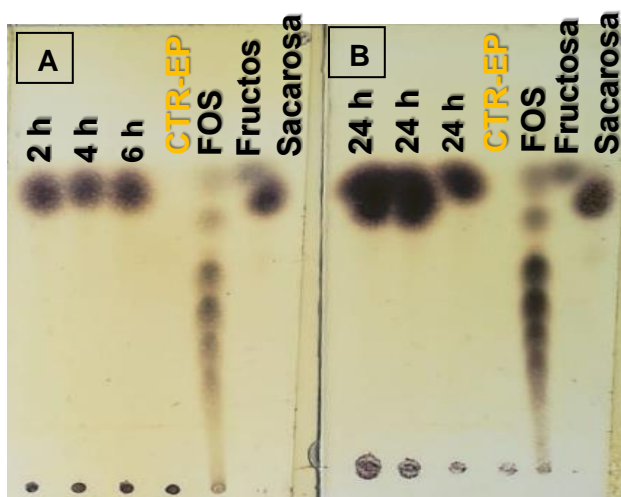
**Figura 10. Análisis por CCF de las reacciones enzimáticas de las distintas muestras obtenidas durante el proceso de purificación.** Siendo **EP** la enzima pura; **L** el extracto liofilizado y **S** el sobrenadante crudo del medio usando como sustrato agavina al 1% (m/v). Controles: fructosa 1% (m/v) y agavina 1% (m/v) en buffer de acetatos 50 mM a pH= 5. Se usó un medio de elución: *n*-BuOH:MeOH:H<sub>2</sub>O (5:3:2) y se aplicó 2.5 µL de cada muestra.

En la **Figura 10**, se observa tanto en el sobrenadante crudo (**S**) como en el extracto liofilizado (**L**) que hay actividad hidrolítica frente agavina al 1% (m/v). De forma similar, se puede apreciar para la enzima pura (**EP**) que también hay actividad hidrolítica, lo cual confirma que se trata de una inulinasa extracelular. A su vez, todo parece indicar que esta inulinasa es del tipo exo-, ya que al efectuar la hidrólisis de dicho fructano, se generan como productos principales la fructosa y la glucosa, monosacáridos que muestran el mismo desplazamiento o factor de retención ( $R_f$ ) en la cromatopla, ya que ambos tienen el mismo peso molecular. En pocas palabras, se confirma que *K. marxianus* AZ8 produce una exo-inulinasa extracelular (ACH1).

## V.2. Reacciones de transfructosilación con la exo-inulinasa ACH1 proveniente de *Kluyveromyces marxianus* AZ8

El siguiente paso fue evaluar la reacción de transfructosilación con la exo-inulinasa ACH1 pura, lo cual se realizó utilizando la sacarosa como sustrato principal.

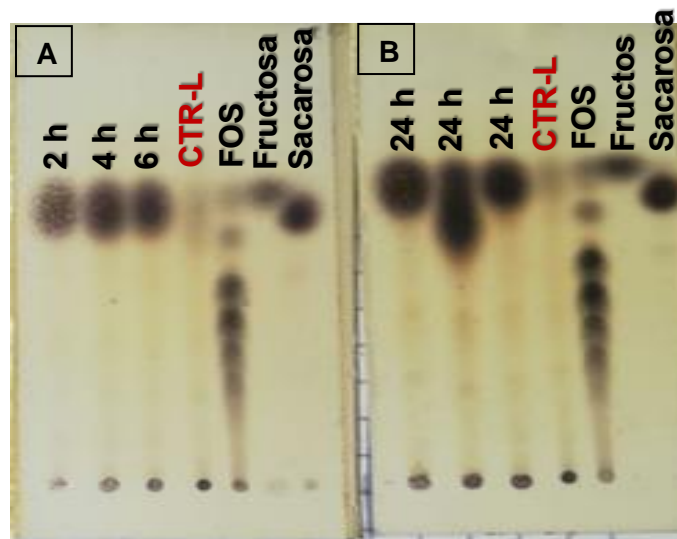
En un principio, se optó por trabajar con las condiciones óptimas de hidrólisis enzimática, las cuales consistieron en resuspender a la enzima pura en solución amortiguadora de acetatos 50 mM a pH 5 incubándola a una temperatura de 50°C a 500 rpm a diferentes tiempos de reacción (2, 4, 6 y 24 h). Para llevar a cabo la reacción de transfructosilación se utilizó sacarosa al 10% (m/v). Los resultados se ilustran en la **Figura 11**.



**Figura 11. Análisis por CCF de las reacciones enzimáticas de transfructosilación a diferentes tiempos de reacción con la enzima pura.** Reacción de la enzima pura con sacarosa al 10% (m/v) en buffer de acetatos 50 mM a pH= 5 a 50°C por 500 rpm de 2 a 24 h. Controles: Enzima pura (**CTR-EP**), FOS 0.5% (m/v), Fru 1% (m/v) y Sacarosa 10% (m/v). Medio de elución: *n*-BuOH:MeOH:H<sub>2</sub>O (5:3:2); **A**) muestra 0.5  $\mu$ L. **B**) muestra 3, 2, 1  $\mu$ L.

De forma similar, otros ensayos de transfructosilación se realizaron empleando las mismas condiciones de trabajo, sólo que esta vez se utilizó el extracto liofilizado.

Nuevamente, los productos de reacción se monitorearon por CCF, obteniendo los resultados cromatográficos a diferentes tiempos de reacción y que se ilustran en la **Figura 12**:



**Figura 12. Análisis por CCF de las reacciones enzimáticas de transfructosilación a diferentes tiempos de reacción con el extracto liofilizado.** Reacción del extracto liofilizado con sacarosa al 10% (m/v) en buffer de acetatos 50 mM a pH= 5 a 50°C por 500 rpm de 2 a 24 h. Controles: Extracto liofilizado (**CTR-L**), FOS 1% (m/v), Fru 1% (m/v) y Sacarosa 10% (m/v). Medio de elución: *n*-BuOH:MeOH:H<sub>2</sub>O (5:3:2); **A**) muestra 0.5 µL. **B**) muestra 1, 2, 0.5 µL.

En la **Figura 11**, se puede observar que con la enzima pura sólo se lleva a cabo la reacción de hidrólisis, ya que únicamente se observan la fructosa y la glucosa, no se observan los FOS que son los productos de la transfructosilación, éstos deberían aparecer entre el punto de aplicación y la mancha de la fructosa. Mientras que en la **Figura 12**, se observa un barrido tenue a las 2, 4, 6 y 24 h de reacción en los ensayos realizados con el extracto liofilizado, lo cual nos indica que la enzima ACH1 presente en el sólido, probablemente esté llevando a cabo dicha reacción y, por ende, lográndose sintetizar los FOS en el medio.

Con el fin de identificar los productos de la transfructosilación, se utilizó la técnica HPAEC-PAD (High Performance Anion-Exchange Chromatography Coupled with Pulsed Amperometric Detection, por sus siglas en inglés) que es más sensible para la separación e identificación de carbohidratos.

Inicialmente, para este tipo de análisis, se realizó la separación cromatográfica de un estándar denominado **Estándar P95: Inulinas**, el cual consiste de glucosa, fructosa, sacarosa, además de un conjunto de FOS del tipo inulina. Los tiempos de retención para los compuestos de este estándar se listan en la **Tabla 12**. Las condiciones de separación de esta técnica se describen en el apartado de métodos experimentales.

**Tabla 12.** Nomenclatura y tiempos de retención de los componentes del **Estándar P95:** FOS del tipo inulina

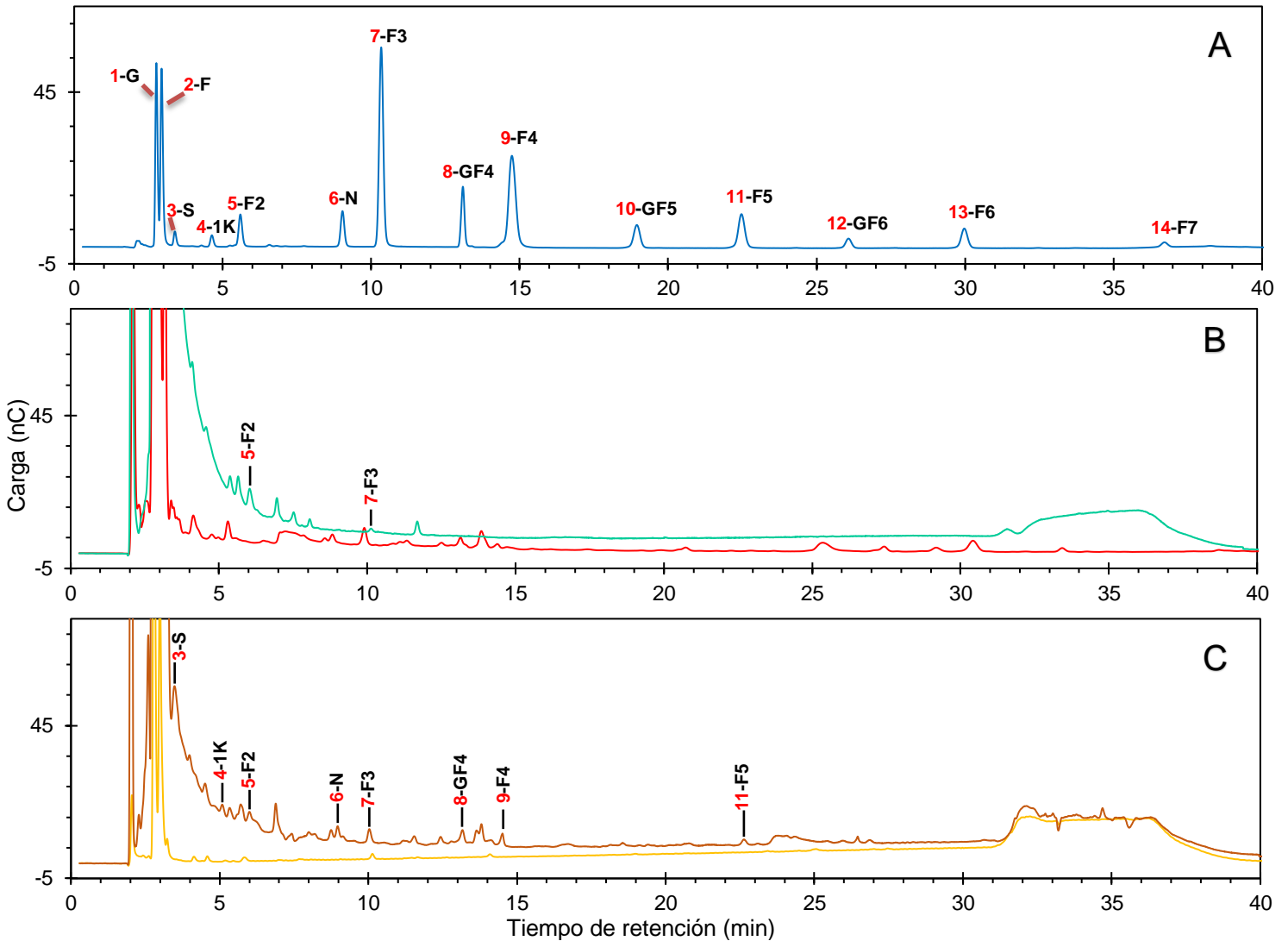
Número	Nomenclatura	Nombre	Tiempo de retención (min)
1	G	Glucosa	2.77
2	F	Fructosa	2.94
3	S	Sacarosa	3.39
4	1K	1-kestosa	4.63
5	F2	Difrufructosa	5.58
6	N	1-nistosa	9.03
7	F3	Trifrufructosa	10.35
8	GF4	Fructosilnistosa	13.10
9	F4	Tetrafructosa	14.73
10	GF5	Polímero fructosilo	18.94
11	F5	Pentafructosa	22.47
12	GF6	Polímero fructosilo	26.08
13	F6	Hexafructosa	29.98
14	F7	Heptafructosa	36.69

Es importante mencionar que las enzimas utilizadas en la producción de FOS a partir de la transfructosilación de la sacarosa, se clasifican en dos grupos principales: FTasas y  $\beta$ -FFasas.

Las FTasas poseen una alta actividad de transfructosilación que cataliza la *transferencia de grupos fructosilo* de la sacarosa (donador) durante el proceso de síntesis de dichos oligosacáridos. Mientras que las  $\beta$ -FFasas poseen actividad *tanto hidrolítica como de transfructosilación*, ya que catalizan la ruptura del enlace  $\alpha$ -(1→2) de la sacarosa y transfieren la unidad de fructosilo a otra molécula de sacarosa (receptora).

La catálisis de ambos grupos de enzimas da como resultado la síntesis de FOS siendo la 1-kestosa (**GF<sub>2</sub>**), la 1-nistosa (**GF<sub>3</sub>**) y la fructosilnistosa (**GF<sub>4</sub>**) los productos principales, mientras que los polímeros fructosilo (**GF<sub>5</sub>** a **GF<sub>9</sub>**) son los menos abundantes. A su vez, se producen, en pequeñas cantidades, otros compuestos como los monosacáridos de glucosa (**G**) y fructosa (**F**). Es conveniente señalar que las abreviaturas corresponden a el número de moléculas de glucosa y de fructosa.

Dicho esto, se realizó el análisis cromatográfico de los productos de reacción a 24 h, tanto con la enzima pura como con el extracto liofilizado utilizando sacarosa al 10% (m/v) a un pH de 5 a 50°C. Los cromatogramas de este análisis se muestran en la **Figura 13**.



**Figura 13. Análisis de las reacciones enzimáticas para la actividad de transfructosilación a través de la técnica HPAEC-PAD.**

**A.** Cromatograma de la solución estándar de FOS del tipo inulina, donde la línea azul (—) representa cada FOS y su respectiva nomenclatura.

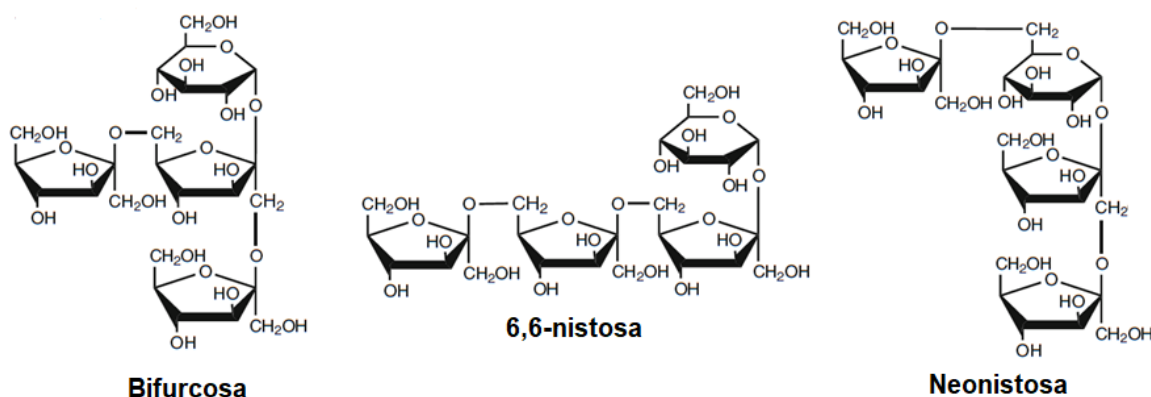
**B.** Cromatograma del extracto liofilizado con sacarosa al 10% (m/v) a 24 h de reacción (**RX-L**), donde la línea verde (—) representa los productos de la reacción y la línea roja (—) el control del extracto liofilizado (**CTR-L**).

**C.** Cromatograma de la enzima pura con sacarosa al 10% (m/v) a 24 h de reacción (**RX-EP**); donde la línea café (—) representa los productos de la reacción y la línea amarilla (—) el control de la enzima pura (**CTR-EP**).

En el cromatograma de la **Figura 13.C.**, se logró identificar la producción de algunos de FOS (del tipo  $F_n$  y  $GF_n$ ) sintetizados por la exo-inulinasa ACH1 pura a dichas condiciones de reacción. Los productos obtenidos fueron 1-kestosa (1K), difructosa (F2), 1-nistosa (N), trifructosa (F3), fructosilnistosa (GF4), tetrafructosa (F4) y pentafructosa (F5) usando sacarosa al 10% (m/v), entre otros FOS no identificados

por el mismo estándar. Mientras que, en la reacción con el extracto liofilizado, sólo hubo producción de difructosa (F2), trifructosa (F3) y otras señales no identificadas como se observa en el cromatograma de la **Figura 13.B**. Sin embargo, si se traslapasen ambos cromatogramas, se aprecia que algunos productos de dichas reacciones enzimáticas coinciden, es decir, producen el mismo tipo de FOS lineal, tal es el caso de la difructosa (F2) y trifructosa (F3).

De manera similar, esto sucede con las tres señales no identificadas entre las dos series de productos de la reacción enzimática, las cuales comprenden entre los estándares de F2 y N (5 a 10 min de tiempo de retención). Con base en el rango donde se ubican estos tres picos (**Figuras 13.B** y **13.C**), se puede inferir que, posiblemente, se tratan de FOS ramificados o lineales con enlace  $\beta$ -(2,6), ya que la N se compone de una molécula de 1-kestosa (**GF<sub>2</sub>**) unida por un enlace  $\beta$ -(2,1) a otra molécula de Fru formando un tetrasacárido. Por lo tanto, se podrían proponer las siguientes tres estructuras químicas de dicho tipo de FOS:



**Figura 13.1. Estructuras posibles de FOS ramificados o lineales.** Tetrasacáridos (lineal o ramificados) compuestos por una molécula de sacarosa, en la cual dos unidades de Fru se unen a diferentes posiciones tanto en la Glc como en la Fru del disacárido.

A su vez, se observa la producción de Glc (G) y Fru (F), así como la presencia de sacarosa (S) en el medio de reacción de ambos ensayos enzimáticos, identificadas por las tres primeras bandas del estándar, respectivamente (**Figuras 13.B** y **13.C**).

Dado que la producción de la exo-inulinasa ACH1 pura proveniente de *K. marxianus* AZ8 resulta ser de bajo rendimiento, los siguientes ensayos se realizaron con el extracto liofilizado; éste se dializó por 24 h en un amortiguador de acetatos 50 mM a pH 5 y se concentró por liofilización y en función de su actividad específica (U/mg proteína), se utilizó el sólido para hacer la transfructosilación bajo diferentes condiciones de reacción.

Es importante señalar que la actividad de transfructosilación puede verse afectada por diversos factores entre los que se encuentran la presencia de solventes orgánicos, temperatura, pH, concentración inicial de sustrato y concentración de



enzima, entre otros (Falconer, Mukerjea, & Robyt, 2011). A continuación, se describen los efectos de dichos factores sobre la actividad catalítica de la exo-inulinasa ACH1 presente en el extracto liofilizado y la producción de FOS.

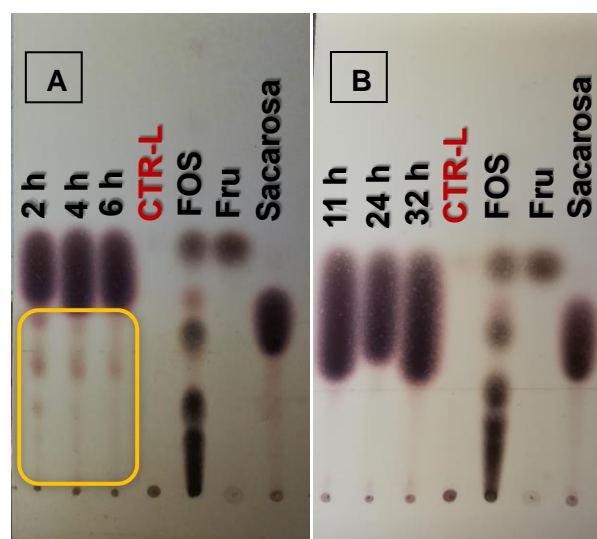
### V.2.1. Efecto de la concentración de sacarosa sobre la actividad de transfructosilación enzimática

Primero, se analizó la influencia de la concentración de sacarosa como sustrato inicial sobre la actividad de transfructosilación de la exo-inulinasa ACH1 presente en el extracto liofilizado para la producción de FOS.

Para ello, se incrementó la cantidad de enzima (extracto liofilizado) y se realizaron pruebas a diferentes concentraciones de sacarosa (10 al 45% m/v). Con base en los Antecedentes (Risso *et al.*, 2010), se encontró que al trabajar con sacarosa al 45% (m/v) se lleva a cabo el proceso de transfructosilación.

Los ensayos fueron incubados a 50°C de 2 a 32 h de reacción y los productos obtenidos se monitorearon por CCF, en los que se observó que, a partir de 2 a 6 h de incubación, hubo presencia de FOS, mientras que a más de 11 h de reacción no se observa la producción de FOS (**Figura 14**).

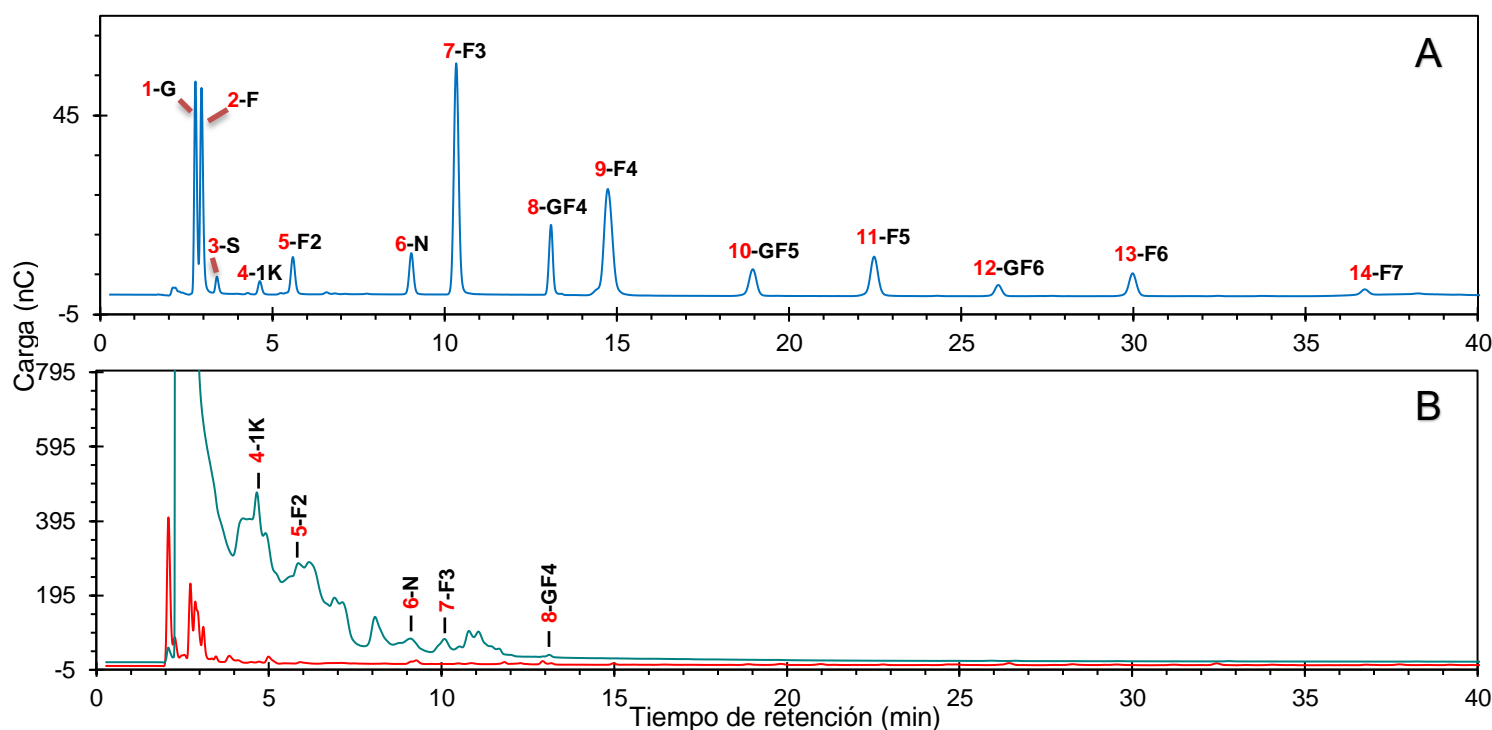
Estudios reportan que a tiempos largos de reacción de síntesis de fructanos, las enzimas GH como la levansacarasa de *Bacillus subtilis*, SacB, utiliza como sustrato al levano, previamente sintetizado, el cual hidroliza a través de un mecanismo del tipo exo (Méndez-Lorenzo *et al.*, 2015).



**Figura 14. Análisis por CCF de las reacciones enzimáticas de transfructosilación a diferentes tiempos de reacción y mayor concentración del sustrato.** Reacción del extracto liofilizado con sacarosa al 45% (m/v) en buffer de acetatos 50 mM a pH= 5 a 50°C por 500 rpm de 2 a 32 h. Controles: Extracto liofilizado (**CTR-L**), FOS 1% (m/v), Fru 1% (m/v) y Sacarosa 45% (m/v). Medio de elución: *n*-BuOH:MeOH:H<sub>2</sub>O (5:3:2); **A)** muestra 0.5 µL. **B)** muestra 0.5 µL.

Se realizó el estudio cromatográfico del ensayo enzimático incubado a 2 h de reacción. En el estudio de la **Figura 15.B.**, se observa que a determinada concentración de enzima (8390 U/mg proteína) y al incrementar la concentración de sacarosa (45% (m/v)) se favorece la actividad de transfructosilación sobre la hidrólisis, obteniendo como resultado la producción de FOS.

Con ayuda de los estándares, se logró identificar 1K, F2, N, F3 y GF4, compuestos del tipo inulina, es decir, que presentan enlaces glicosídicos del tipo  $\beta$ -(2,1). En el mismo cromatograma **15.B.**, se observan tres bandas que no se logran identificar en función a la solución estándar, lo cual nos lleva a inferir que posiblemente se estén produciendo otras formas y/o estructuras de FOS tales como oligosacáridos ramificados como se observó en los cromatogramas de las **Figuras 13.B.** y **13.C.**



**Figura 15. Análisis de las reacciones enzimáticas para la actividad de transfructosilación del extracto liofilizado a diferentes % m/v de sacarosa a través de la técnica HPAEC-PAD.**

**A.** Cromatograma de la solución estándar de FOS del tipo inulina, donde la línea azul (—) representa cada FOS y su respectiva nomenclatura.

**B.** Cromatograma del extracto liofilizado con sacarosa 45% (m/v) a 2 h de reacción; donde la línea de color turquesa (—) representa los productos de la reacción y línea roja (—) el control del extracto liofilizado (CTR-L), respectivamente.

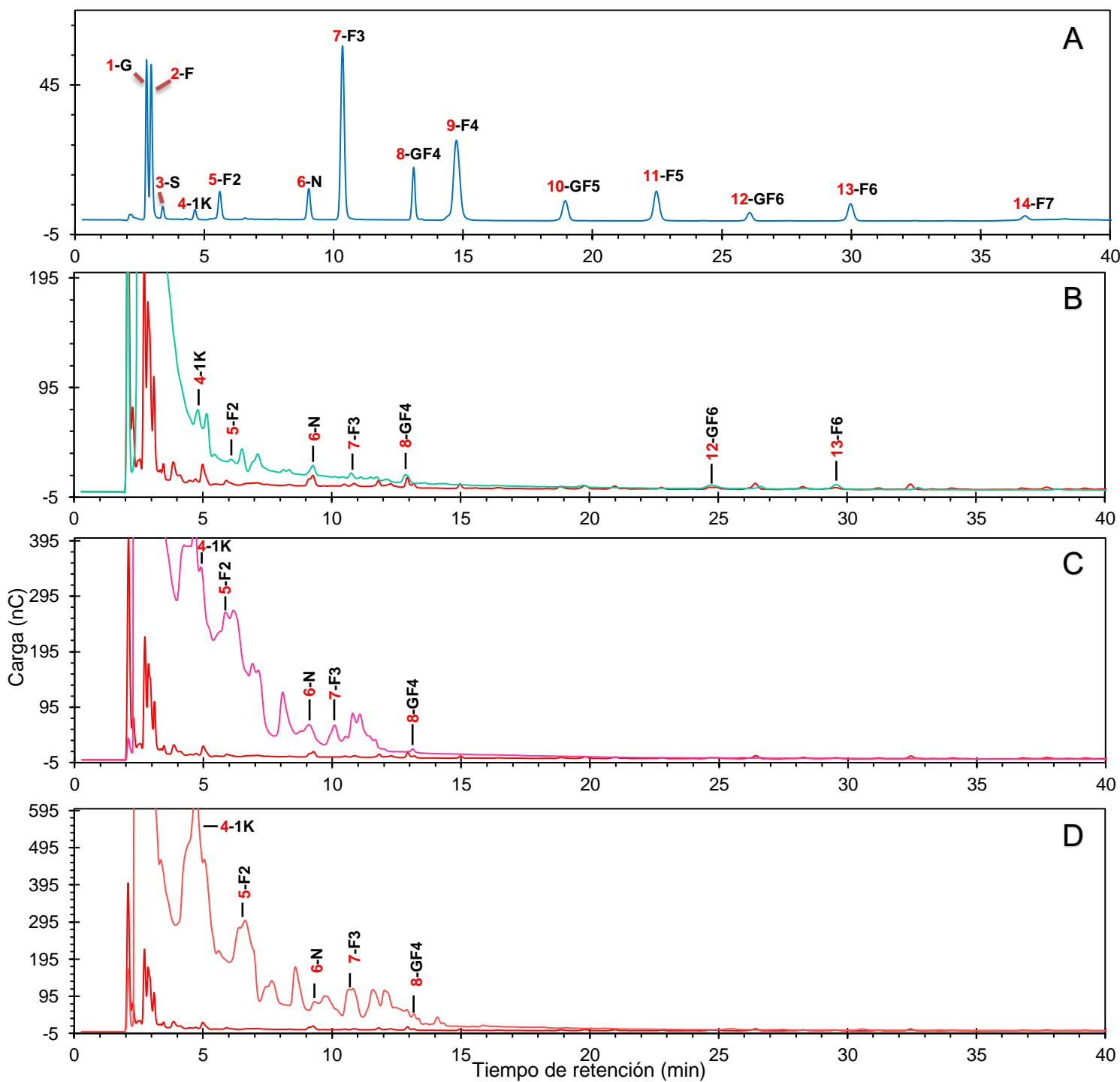
Al mismo tiempo, se realizaron otros ensayos de actividad enzimática a diferentes concentraciones de sacarosa al 10, 15 y 45% (m/v) en un tiempo de 30 min de reacción. Los productos de reacción se analizaron por cromatografía HPAEC-PAD (**Figura 16**), donde en la **Figura 16.B.** se observa la producción de 1K, F2, N, F3, GF4, GF6 y F6 en un medio de 10% (m/v) de sacarosa, mientras que en las **Figuras**

**16.C.** y **16.D.** se observa la producción de 1K, F2, N, F3 y GF4 a partir de 15 y 45% (m/v) de sacarosa, respectivamente.

Algunos estudios reportan que, dada la competencia entre la molécula de agua y la molécula aceptora, la eficiencia de la actividad de transferasa siempre está limitada por la reacción de hidrólisis. Sin embargo, al incrementar la concentración de la sacarosa en el medio, esto favorece la reacción hacia la transferencia debido a que existe una alta afinidad por dicho sustrato, quien actuará como aceptor y donador de fructosas (Olvera *et al.*, 2012). Existen reportes de que una vez formado el intermediario enzima-fructosilo (EF), la sacarosa compite favorablemente con el agua y con otros FOS como aceptores de residuos de fructosilo (Chuankhayan *et al.*, 2010; Fernández *et al.*, 2004; Plou *et al.*, 2007)

Otros estudios comprueban que, al aumentar la concentración de sacarosa inicial, se incrementa la actividad de transfructosilación, mientras que la actividad hidrolítica se reduce. En materia de las inulinasas provenientes de levaduras, Santos y Maugeri (2007) reportan que la inulinasa de *K. marxianus* var. *bulgaricus* fue capaz de producir FOS a partir de concentraciones al 45% (m/v) de sacarosa en un medio acuoso. De igual forma, Risso *et al.* (2010) comprueba que, a dicha concentración de sacarosa, la inulinasa de *K. marxianus* ATCC 16045 logró sintetizar FOS obteniendo una máxima conversión del 12.7% (p/p), también en medio acuoso.

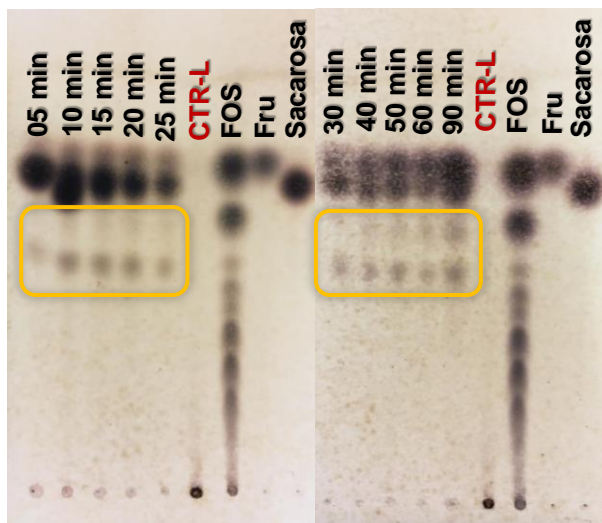
Algunos autores reportan que la inulinasa de *K. marxianus* NRRL Y-7571, presenta actividad transferasa en medios acuosos y medios orgánicos utilizando concentraciones mayores de sacarosa al 55 y 60% (m/v), respectivamente (Risso *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2013).



**Figura 16. Análisis de las reacciones enzimáticas para la actividad de transfructosilación del extracto liofilizado a diferentes % m/v de sacarosa a través de la técnica HPAEC-PAD. A.** Cromatograma de la solución estándar de FOS del tipo inulina, donde la línea azul (—) representa los FOS y su respectiva nomenclatura; **B., C., D.** Cromatogramas del extracto liofilizado con sacarosa 10, 15 y 45% (m/v) a 30 min de reacción; donde las líneas de color verde (—), rosa (—) y naranja (—) representan los productos de las reacciones, respectivamente; mientras la línea roja (—) el control del extracto liofilizado (**CTR-L**).

## V.2.2. Efecto del tiempo de reacción en la actividad de transfructosilación enzimática

El tiempo es un factor importante que afecta la síntesis de FOS. En este estudio se observó que a partir de 2 h de reacción hay presencia de FOS a una concentración de sacarosa al 45% (m/v). Por tanto, se decidió evaluar el tiempo de reacción a periodos más cortos trabajando bajo las mismas condiciones de actividad hidrolítica, cuyos productos de reacción fueron monitoreados por CCF (**Figura 17**):



**Figura 17. Análisis por CCF de las reacciones enzimáticas de transfructosilación a diferentes tiempos cortos de reacción.** Reacción del extracto liofilizado con sacarosa al 45% (m/v) en buffer de acetatos 50 mM a pH= 5 a 50°C por 500 rpm de 5 a 90 min. Controles: Extracto liofilizado (**CTR-L**), FOS 1% (m/v), Fru 1% (m/v) y Sacarosa 45% (m/v). Medio de elución: *n*-BuOH:MeOH:H<sub>2</sub>O (3:2:1); Muestra 0.5 µL.

En la **Figura 17** se puede observar que, a tiempos cortos de reacción, de 10 a 30 min, sí se llevó a cabo la reacción de transfructosilación. Mientras que, a tiempos superiores de 30 min, aparentemente, hay una menor síntesis de FOS, dado que se observa una menor intensidad de las manchas.

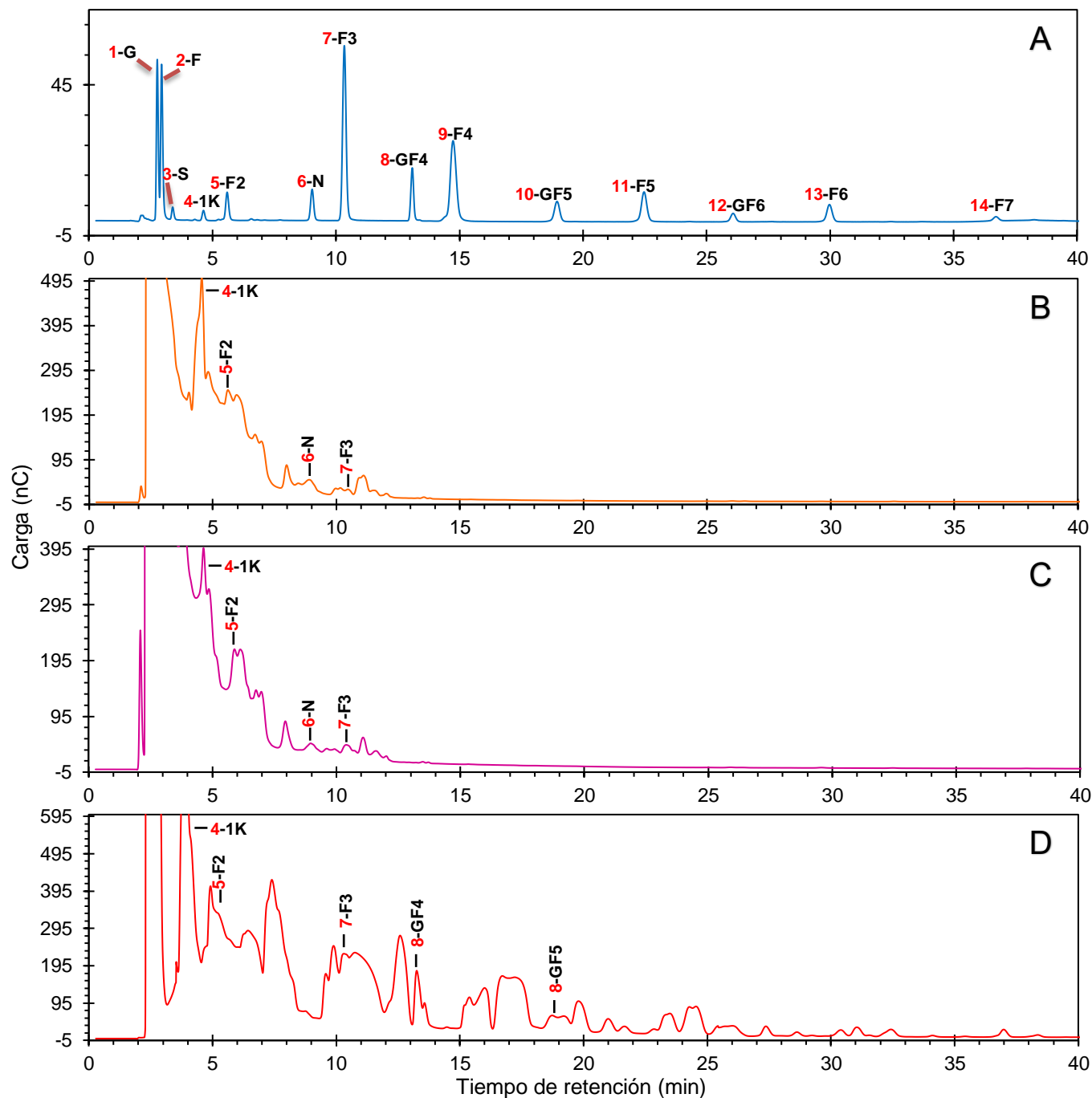
Al mismo tiempo, se aprecia que los monosacáridos Fru y Glc junto con la sacarosa resultan ser los productos de mayor predominancia, conforme el tiempo incrementa a 90 min, lo cual se puede explicar por medio del mecanismo de reacción de la inulinasa y su actividad de transfructosilación.

El sitio catalítico de la inulinasa ACH1 tiene dos aspartatos (Asp) y un glutamato (Glu), los cuales catalizan la transfructosilación. Primero, uno de los Asp realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono anomérico de la Glc del disacárido produciendo la ruptura del enlace  $\alpha$ -(1,2), a partir del cual se liberan Glc y Fru. Siempre y cuando las condiciones del medio favorezcan el equilibrio hacia la transfructosilación, esta unidad de Fru libre puede enlazarse a una sacarosa o a otro FOS, los cuales actúan como moléculas aceptoras (Vega & Zuniga-Hansen, 2014).

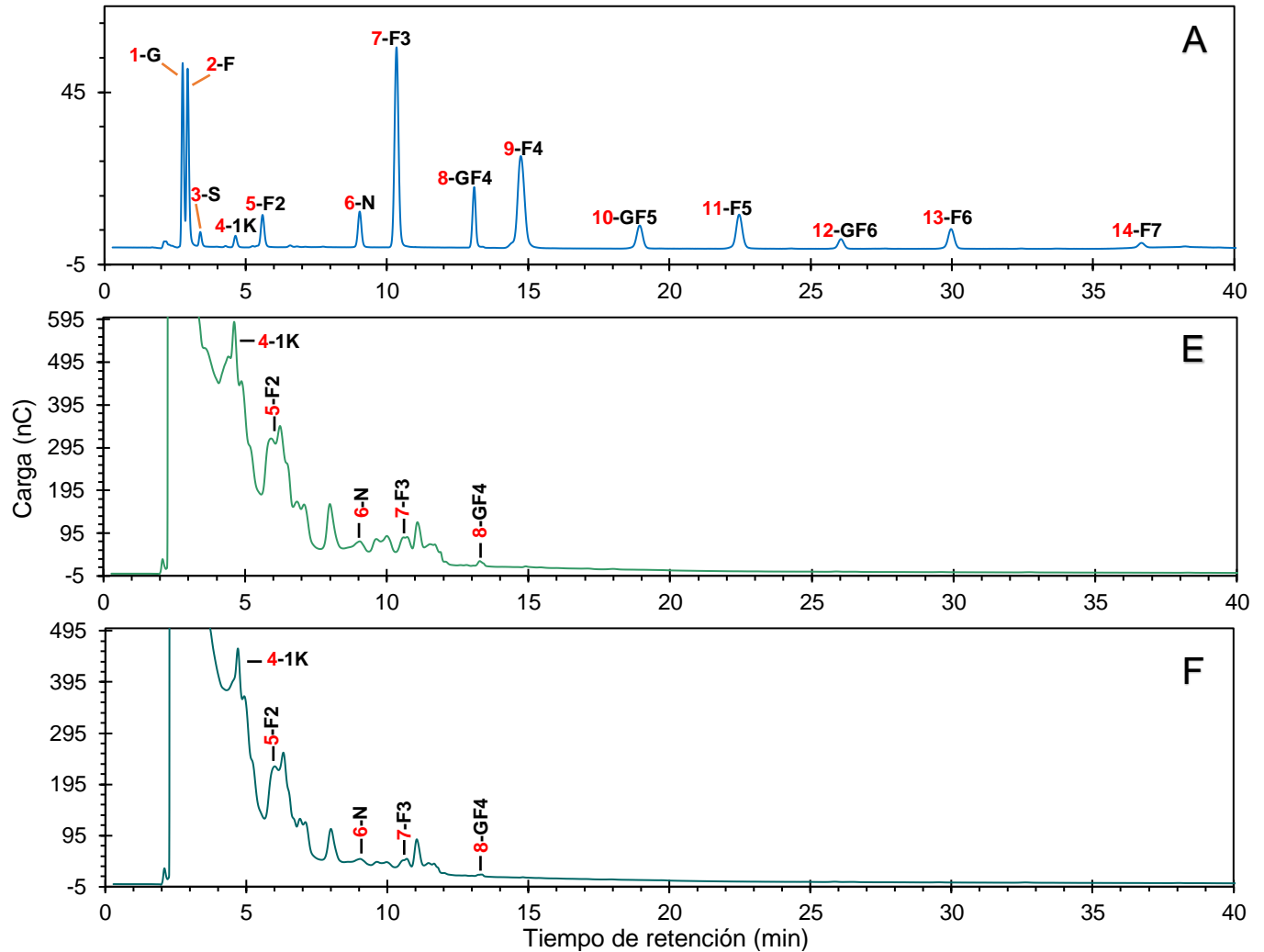
Conforme el tiempo transcurre, la enzima realizará esta reacción una y otra vez hasta que dos situaciones ocurran: la primera, al disminuir la alta concentración de sacarosa en el medio, esto puede favorecer la actividad de hidrólisis de la enzima y comience a actuar sobre los FOS previamente sintetizados, como es el caso de la levansacarasa SacB, quien al sintetizar levano, al cabo de un largo tiempo de reacción, ésta lo utiliza como sustrato y comienza a hidrolizarlo en los extremos liberando unidades de Fru y Glc (Méndez-Lorenzo *et al.*, 2015). La segunda es que al tener un exceso de Glc en el medio, ésta actúa como un inhibidor competitivo haciendo que la enzima no transfructosile toda la sacarosa a FOS, es decir, inhibe su actividad catalítica.

Por otro lado, se realizó el análisis cromatográfico HPAEC-PAD (**Figura 18**) de los distintos tiempos de reacción evaluados para la síntesis de FOS. En los cromatogramas **18.B.** y **18.C.** de 10 y 20 min de reacción, se logró identificar a los compuestos 1K, F2, N y F3, respectivamente. Mientras que en el cromatograma **18.D.** de 30 min de reacción, se identificó a 1K, F2, F3 y GF4, sin embargo, se observan varias señales a diferentes tiempos de retención a lo largo del cromatograma. Esto sugiere que, probablemente, existen diversos tamaños de FOS e inclusive de estructura ramificada, por tal razón, se decidió considerar a este tiempo como el mejor tiempo de reacción. Y, por último, en los cromatogramas **19.E.** y **19.F.** de 60 y 90 min de reacción, sólo se identificaron a los FOS 1K, F2, N, F3 y GF4, respectivamente.

En todos los cromatogramas se observaron otras señales que no corresponden con los tiempos de retención del **Estándar P95: inulinas**. El primer par de bandas se ubicó entre los 6 y 9 min de retención, mientras que la tercera banda en los 11 min de retención (**Figuras 18 y 19**), con base en sus tiempos de retención se puede proponer que se traten de tetrasacáridos y pentasacáridos de estructura ramificada.



**Figura 18. Análisis de las reacciones enzimáticas para la actividad de transfructosilación a cortos tiempos de reacción, a través de la técnica HPAEC-PAD. A.** Cromatograma de la solución estándar de FOS del tipo inulina, donde la línea azul (—) representa los FOS y su respectiva nomenclatura; **B., C., D.** Cromatogramas del extracto liofilizado con sacarosa 45% (m/v) a 10, 20 y 30 min de reacción; donde las líneas de color naranja (—), violeta (—) y rojo (—) representan los productos de las reacciones a diferentes tiempos de reacción, respectivamente.



**Figura 19. Análisis de las reacciones enzimáticas para la actividad de transfructosilación a tiempos cortos de reacción, a través de la técnica HPAEC-PAD. A.** Cromatograma de la solución estándar de FOS del tipo inulina, donde la línea azul (—) representa los FOS y su respectiva nomenclatura; **E., F.** Cromatogramas del extracto liofilizado con sacarosa 45% (m/v) a 60 y 90 min de reacción; donde las líneas de color verde (—) y turquesa (—) representan los productos de las reacciones a diferentes tiempos de reacción, respectivamente.

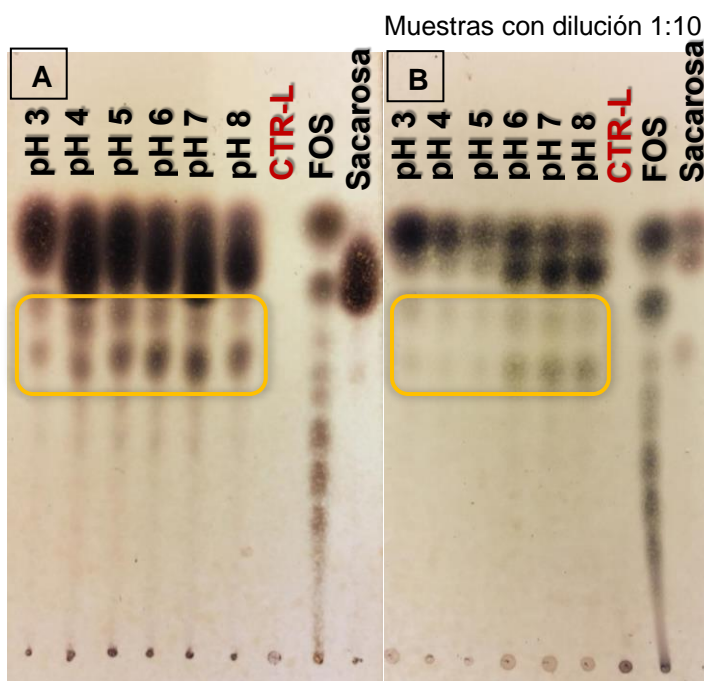
A diferencia de los resultados mostrados en este trabajo, en el cual la producción de FOS se observa en tiempos menores a dos horas, en la literatura se han reportado tiempos de reacción entre 8 y 12 h para la transfructosilación catalizada por inulinasas aisladas de *K. marxianus* sp. (Risso *et al.*, 2009; Santos & Maugeri, 2007).



### V.2.3. Efecto del pH sobre la actividad de transfructosilación enzimática

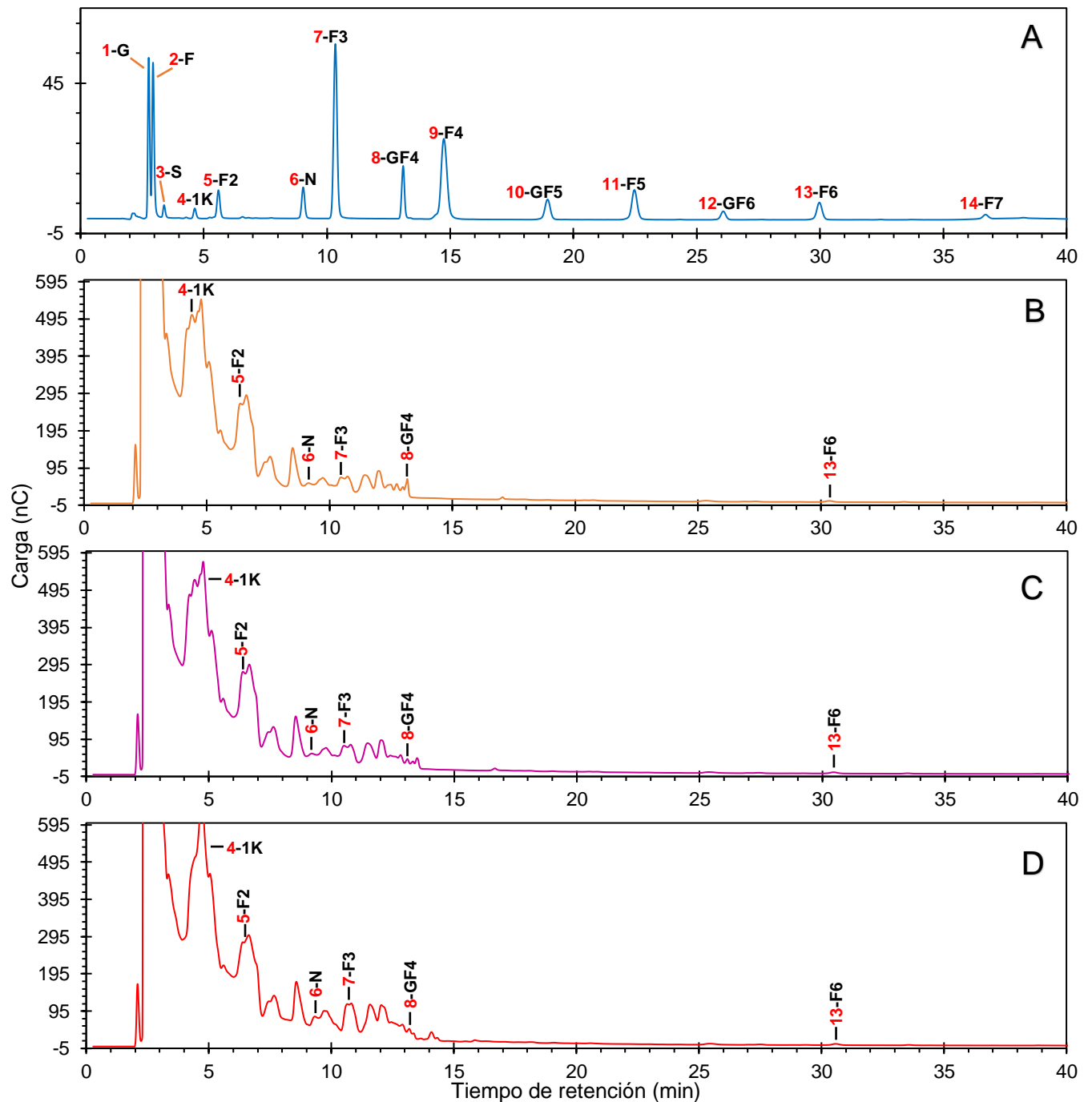
Una vez que se determinó el mejor tiempo de reacción (30 min), se evaluó el efecto del pH sobre la actividad de transfructosilación. Se realizaron ensayos a diferentes valores de pH, tomando en cuenta la actividad de la enzima, el tiempo de reacción (30 min) y la concentración del sustrato, sacarosa al 45% (m/v).

El desarrollo de las reacciones enzimáticas se realizó mediante CCF (**Figura 20**); se observa que entre pH 3 y 8 hay producción de FOS durante los 30 min de reacción. No obstante, pareciera que a pH mayor de 5 existe una mayor producción de ellos. Además de observarse la producción de Fru y Glc, productos de la hidrólisis de la sacarosa, sustratos necesarios para que la exo-inulinasa ACH1 realice la transfructosilación.

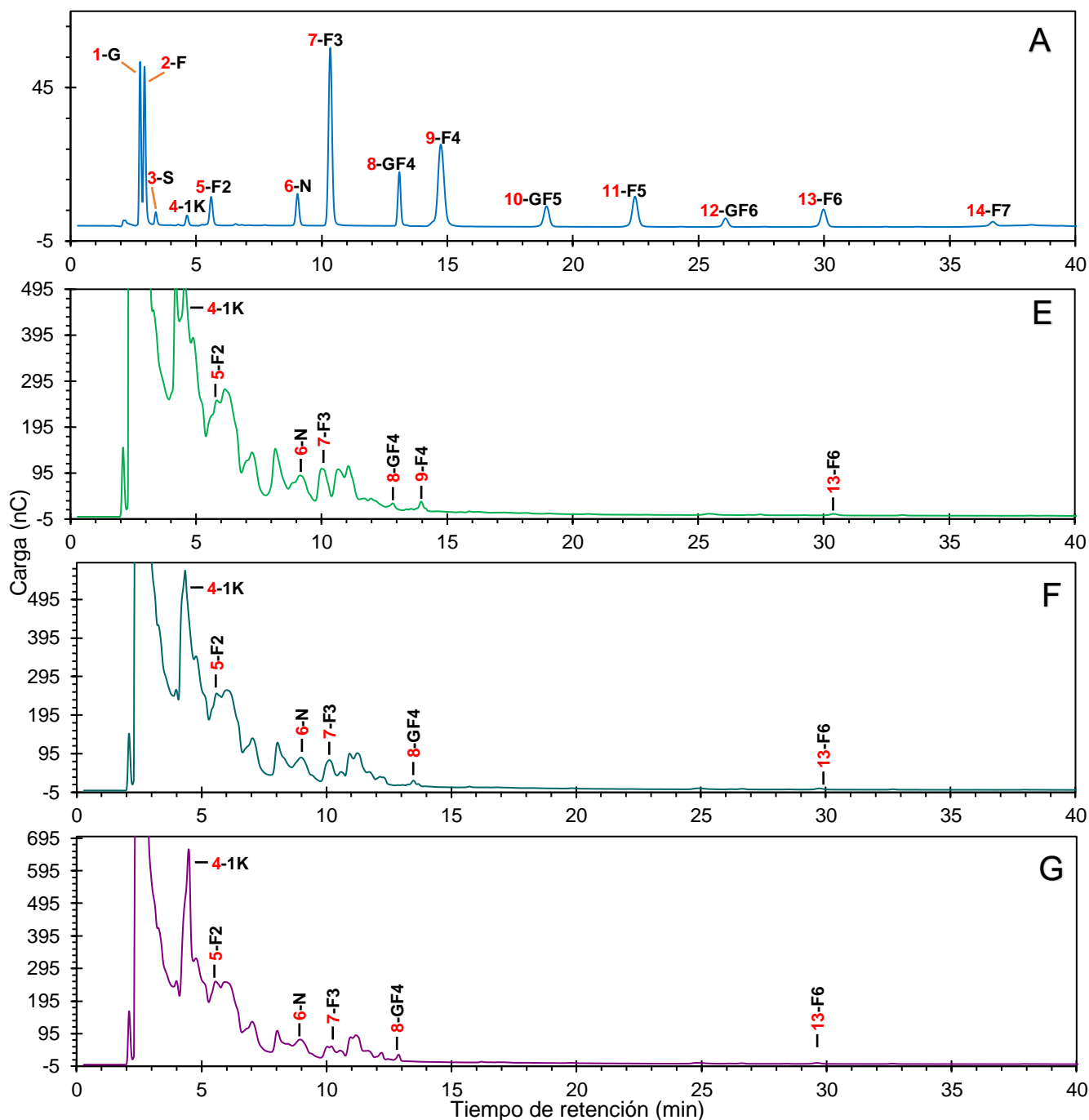


**Figura 20. Análisis por CCF de las reacciones enzimáticas de transfructosilación a diferentes pH de reacción.** Reacción del extracto liofilizado con sacarosa al 45% (m/v) en buffer de acetatos/ fosfatos 50 mM a pH= 3-8 a 50°C por 500 rpm de 30 min. Controles: Extracto liofilizado (**CTR-L**), FOS 1% (m/v), Fru 1% (m/v) y Sacarosa 45% (m/v). Medio de elución: *n*-BuOH:MeOH:H<sub>2</sub>O (3:2:1); **A)** muestra 0.5 µL. **B)** muestra con dilución 1:10, 0.5 µL.

En el estudio cromatográfico HPAEC-PAD (**Figuras 21 y 22**), en todos los valores de pH evaluados, se logró identificar la producción de FOS, como son 1K, F2, N, F3, GF4 y F6. Sin embargo, se observa nuevamente la presencia de señales que no corresponden con los tiempos de retención del estándar, donde las dos primeras bandas se encuentran entre los 6 y 9 min, y las dos segundas bandas entre los 11 y 14 min de retención. Estas señales podrían sugerir la síntesis de FOS ramificados. Además, se observa una señal de baja intensidad a los 30 min de tiempo de retención que corresponde a un FOS con un DP de 6 fructosas.



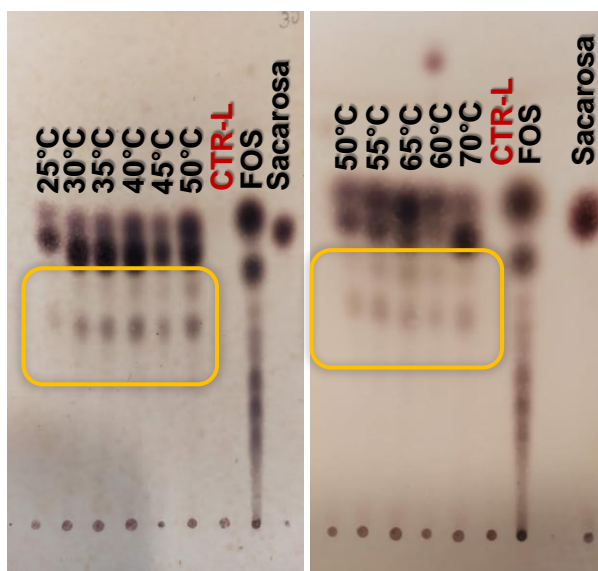
**Figura 21. Análisis de las reacciones enzimáticas para la actividad de transfructosilación a diferentes pH de reacción, a través de la técnica HPAEC-PAD. A.** Cromatograma de la solución estándar de FOS del tipo inulina, donde la línea azul (—) representa los FOS y su respectiva nomenclatura; **B., C., D.** Cromatogramas del extracto liofilizado con sacarosa 45% (m/v) a 30 min de reacción; donde las líneas de color naranja (—), violeta (—) y rojo (—) representan los productos de las reacciones a diferentes valores de pH 3, 4 y 5, respectivamente.



**Figura 22. Análisis de las reacciones enzimáticas para la actividad de transfructosilación a diferentes pH de reacción, a través de la técnica HPAEC-PAD. A.** Cromatograma de la solución estándar de FOS del tipo inulina, donde la línea azul (—) representa los FOS y su respectiva nomenclatura; **E., F., G.** Cromatogramas del extracto liofilizado con sacarosa 45% m/v a 30 min de reacción; donde las líneas de color verde (—), turquesa (—) y morado (—) representan los productos de las reacciones a diferentes valores de pH 6, 7 y 8, respectivamente.

#### V.2.4. Efecto de la temperatura sobre la actividad de transfructosilación enzimática

La última variable ensayada fue la temperatura, las reacciones enzimáticas se realizaron a diferentes temperaturas iniciando en 25°C hasta 70°C. Se utilizó 10 mg de extracto liofilizado en 1.5 mL de volumen de reacción de sacarosa al 45% a pH 6 por 30 min. Las reacciones fueron monitoreadas por CCF (**Figura 23**), en donde se observó la presencia de FOS a partir de 30°C hasta los 70°C. En la CCF se puede observar que a partir de los 55°C la producción de FOS se ve disminuida, aunque es aparente, lo que es necesario confirmar mediante HPAEC-PAD.

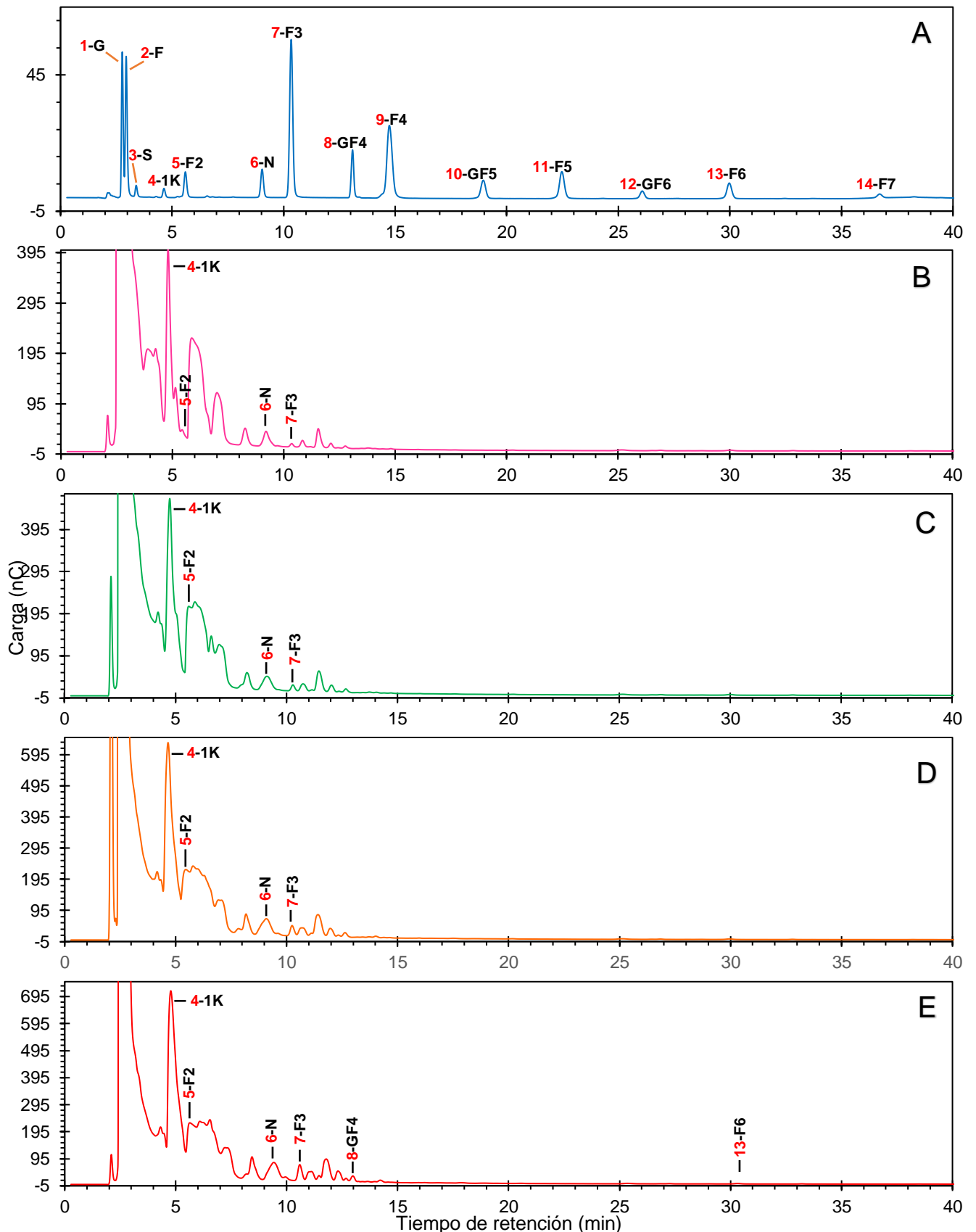


**Figura 23. Análisis por CCF de las reacciones enzimáticas de transfructosilación a diferentes temperaturas de reacción.** Reacción del extracto liofilizado con sacarosa al 45% en buffer de acetatos 50mM a pH= 6 a 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 y 70°C por 500 rpm de 30 min. Controles: Extracto liofilizado (**CTR-L**), FOS 1% (m/v), y Sacarosa 45% (m/v). Medio de elución: *n*-BuOH:MeOH:H<sub>2</sub>O (3:2:1); muestra 0.5 µL.

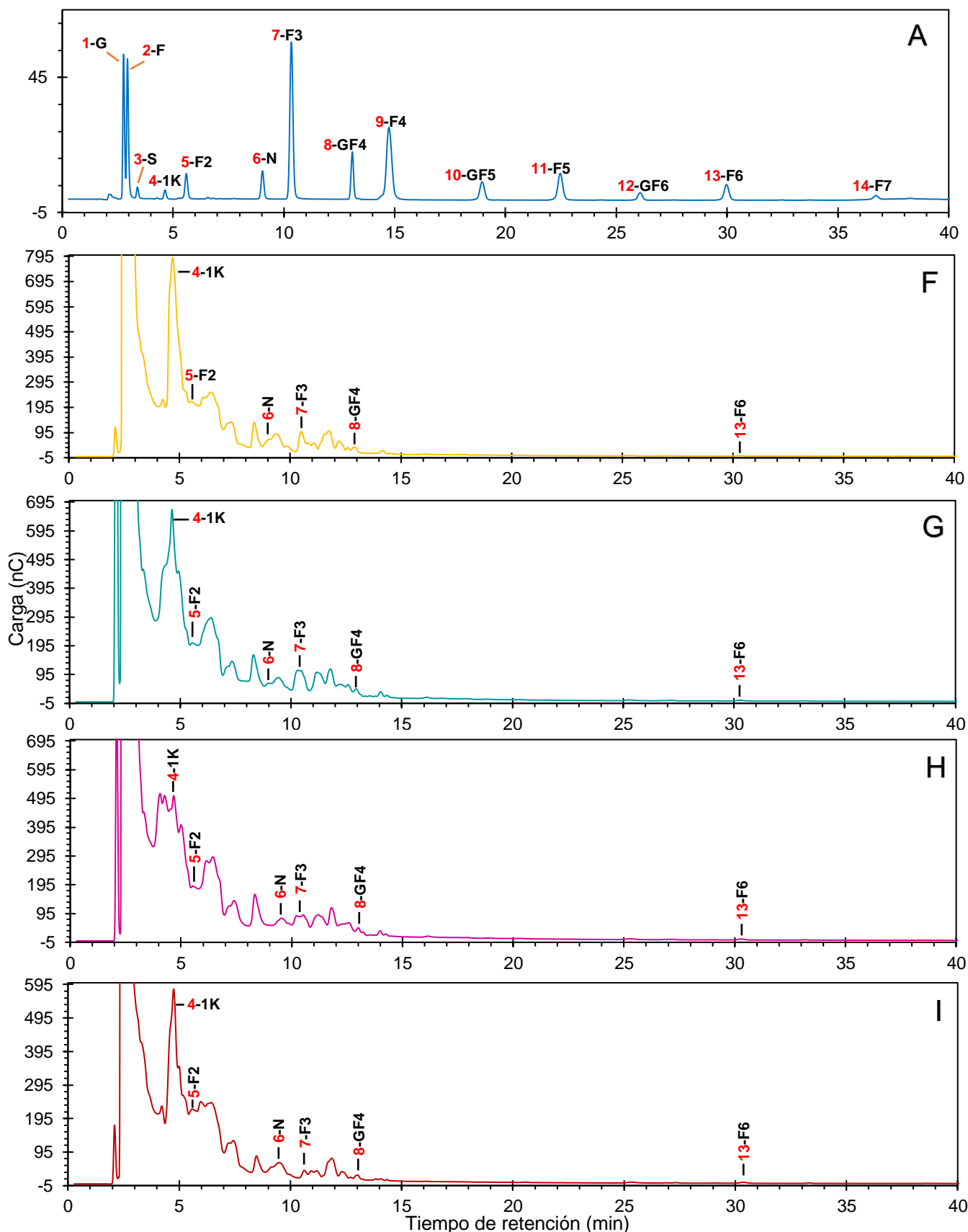
En cuanto al estudio cromatográfico HPAEC-PAD (**Figuras 24 y 25**), se observó que de 25 a 45°C solo se sintetizaron los FOS de 1K, F2, N y F3, mientras que de 50 a 70°C se produjeron los compuestos 1K, F2, N, F3, GF4 y F6, respectivamente. No obstante, en cada temperatura evaluada se observan, en sus respectivos cromatogramas, señales que no coinciden con los tiempos de retención del estándar, donde las tres primeras señales se ubican entre los 6 y 9 min de retención y las cuatro señales restantes entre los 11 y 13 min de retención.

De acuerdo con la literatura, las enzimas que llevan a cabo la transfructosilación presentan un rango de temperaturas óptimas y de pH entre los 50 a 60°C y valores de 4.5 a 6.5, respectivamente. En el caso de *K. marxianus*, algunos estudios reportan temperaturas óptimas de 40, 45 y 50°C y pH de 5 a 6.5 para el proceso de transfructosilación en medios acuosos (Risso *et al.*, 2009; Santos & Maugeri, 2007).

En principio, la exo-inulinasa ACH1 experimenta una disminución en su actividad de hidrólisis cuando ésta se incuba a temperaturas de 55 a 70°C (Guerrero-Corona, 2019), es decir, se desnaturaliza. Sin embargo, en su actividad de transfructosilación se observa que, a dichas temperaturas de reacción, la enzima continúa produciendo FOS, ya que en los cromatogramas de la **Figura 25**, la intensidad de las señales no disminuye. Esto se puede explicar a partir de la formación del complejo enzima-sustrato, donde la sacarosa al ser una molécula pequeña y de estructura sencilla permite una mejor interacción en el sitio catalítico de la enzima, haciendo este complejo más estable y, por ende, difícil de desnaturalizar a la exo-inulinasa ACH1 a temperaturas mayores de 50°C.



**Figura 24. Análisis de las reacciones enzimáticas para la actividad de transfructosilación a diferentes temperaturas de reacción, a través de la técnica HPAEC-PAD. A.** Cromatograma de la solución estándar de FOS del tipo inulina, donde la línea azul (—) representa los FOS y su respectiva nomenclatura; **B., C., D., E.** Cromatogramas del extracto liofilizado con sacarosa 45% m/v a 30 min de reacción; donde las líneas de color rosa (—), verde (—), naranja (—) y rojo (—) representan los productos de las reacciones a diferentes temperaturas 25, 35, 45, y 50°C, respectivamente.



**Figura 25. Análisis de las reacciones enzimáticas para la actividad de transfructosilación a diferentes temperaturas de reacción, a través de la técnica HPAEC-PAD. A.** Cromatograma de la solución estándar de FOS del tipo inulina, donde la línea azul (—) representa los FOS y su respectiva nomenclatura; **F., G., H., I.** Cromatogramas del extracto liofilizado con sacarosa 45% (m/v) a 30 min de reacción; donde las líneas de color amarillo (—), verde (—), morado (—) y guinda (—) representan los productos de las reacciones a diferentes temperaturas 55, 60, 65 y 70°C, respectivamente

Con base en la evidencia experimental obtenida del presente trabajo, la exo-inulinasa ACH1 proveniente de *Kluveromyces marxianus* AZ8 tiene la capacidad de llevar a cabo la reacción de transfructosilación a partir de altas concentraciones de sacarosa (45% m/v), cuyos FOS sintetizados presentan un DP de 3 a 5 unidades de fructosa, es decir, ésta produce FOS de cadena corta (sc-FOS, por sus siglas en inglés).

Entre los sc-FOS que se sintetizaron, se logró identificar a la 1-kestosa (**GF<sub>2</sub>**), la 1-nistosa (**GF<sub>3</sub>**) y fructofuranosil nistosa (**GF<sub>4</sub>**), en donde las unidades de fructosilo se enlazan en la posición  $\beta$ -(2,1) de la sacarosa (Santos & Maugeri, 2007). Dado que nuestro estudio es cualitativo, sólo se puede afirmar que hay un intervalo de temperatura y de pH óptimos (60°C y 6) para la reacción de transfructosilación con la enzima ACH1. Por lo cual sería benéfico determinar de manera cuantitativa la producción de los FOS con ACH1 bajo las condiciones en este trabajo reportadas. Por esta razón, es necesario realizar la cuantificación de los porcentajes de concentración de cada tipo de FOS (1-kestosa, 1-nistosa y fructofuranosil nistosa) e incluso, del sustrato restante de sacarosa y los subproductos generados como la Glc y Fru libre en el medio de cada ensayo realizado a través de métodos analíticos cuantitativos.



## VI. CONCLUSIONES

A partir de la reacción de transfructosilación de la sacarosa, utilizando como catalizador a la exo-inulinasa ACH1 de *Kluyveromyces marxianus* AZ8, se logró sintetizar a los FOS, cuya composición fue de 2 a 6 unidades de Fru siendo del tipo lineal y/o ramificado, estructuralmente.

Por otra parte, las mejores condiciones de reacción para la actividad de transfructosilación fueron el uso de la enzima exo-inulinasa ACH1 presente en el extracto liofilizado con una actividad de 3983 U/mg, en un medio de sacarosa al 45% (m/v) a un pH 6 en 60°C de temperatura por 30 min de reacción.

## PERSPECTIVAS

Comprobar las condiciones de reacción (pH, temperatura, porcentaje m/v de sacarosa, actividad enzimática y tiempo de reacción) para la actividad de transfructosilación con la enzima pura de *Kluyveromyces marxianus* AZ8, así como identificar y analizar los FOS obtenidos tanto por HPAEC-PAD como por CCF.

Determinar la relación hidrólisis/transferencia (H/T) de la exo-inulinasa ACH1 pura.

Determinar el porcentaje de cada tipo de FOS producidos por la exo-inulinasa ACH1 pura.

## VII. REFERENCIAS

- Al-Sheraji, Sadeq Hasan, Ismail, Amin, Manap, Mohd Yazid, Mustafa, Shuhaimi, Yusof, Rokiah Mohd, & Hassan, Fouad Abdulrahman. (2013). Prebiotics as functional foods: A review. *Journal of functional foods*, 5(4), 1542-1553.
- Álvaro-Benito, Miguel, Sainz-Polo, M Angela, González-Pérez, David, González, Beatriz, Plou, Francisco J, Fernández-Lobato, María, & Sanz-Aparicio, Julia. (2012). Structural and kinetic insights reveal that the amino acid pair Gln-228/Asn-254 modulates the transfructosylating specificity of *Schwanniomyces occidentalis*  $\beta$ -fructofuranosidase, an enzyme that produces prebiotics. *Journal of Biological Chemistry*, 287(23), 19674-19686.
- Artyukhov, VG, Kovaleva, TA, Kholyavka, MG, Bityutskaya, LA, Grechkina, MV, & Obraztsova, TB. (2009). Study of the oligomeric structure and some physicochemical properties of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* Y-303. *Biophysics*, 54(6), 675-680.
- Benkeblia, Noureddine. (2014). *Polysaccharides: Natural Fibers in Food and Nutrition*: CRC Press.
- Burgess, Richard R, & Deutscher, Murray P. (2009). *Guide to protein purification*: Academic Press.
- Chuankhayan, Phimonphan, Hsieh, Chih-Yu, Huang, Yen-Chieh, Hsieh, Yi-You, Guan, Hong-Hsiang, Hsieh, Yin-Cheng, . . . Chen, Chun-Jung. (2010). Crystal structures of *Aspergillus japonicus* fructosyltransferase complex with donor/acceptor substrates reveal complete subsites in the active site for catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, 285(30), 23251-23264.
- Coutinho, Pedro M, & Henrissat, Bernard. (1999). Life with no sugars. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 1(2), 307-308.
- Davani-Davari, Dorna, Negahdaripour, Manica, Karimzadeh, Iman, Seifan, Mostafa, Mohkam, Milad, Masoumi, Seyed Jalil, . . . Ghasemi, Younes. (2019). Prebiotics: definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. *Foods*, 8(3), 92.
- Falconer, Daniel J, Mukerjea, Rupendra, & Robyt, John F. (2011). Biosynthesis of dextrans with different molecular weights by selecting the concentration of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC dextransucrase, the sucrose concentration, and the temperature. *Carbohydrate research*, 346(2), 280-284.
- Fernández, Rubén Cuervo, Maresma, Beatriz Guilarte, Juárez, Antonio, & Martínez, Josefina. (2004). Production of fructooligosaccharides by  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus* sp 27H. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 79(3), 268-272.
- Gibson, Glenn R, & Roberfroid, Marcel B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition*, 125(6), 1401-1412.
- Gibson, Glenn R, Scott, Karen P, Rastall, Robert A, Tuohy, Kieran M, Hotchkiss, Arland, Dubert-Ferrandon, Alix, . . . Loh, Gunnar. (2010). Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Sci Technol Bull Funct Foods*, 7(1), 1-19.

- Guerrero-Corona, Marco Antonio. (2019). *Caracterización del crecimiento de Kluyveromyces marxianus AZ8 para la producción y purificación de la inulinasa ACh1*. (Licenciatura), UNAM, México.
- Gupta, Anil Kumar, & Kaur, N. (1997). Fructan storing plants: A potential source of high fructose syrups. *Journal of scientific & industrial research*, 56(8), 447-452.
- Henrissat, Bernard. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical journal*, 280(2), 309-316.
- Holyavka, Marina, Artyukhov, Valeriy, & Kovaleva, Tamara. (2016). Structural and functional properties of inulinases: A review. *Biocatalysis and Biotransformation*, 34(1), 1-17.
- Inthanavong, Lotthida. (2011). *Production and Characterization of the Fructosyltransferase (levansucrase) from Geobacillus Stearothermophilus and Its Application in the Synthesis of Novel Fructooligosaccharides*. McGill University Library,
- Karboune, Salwa, Appanah, Neeyal, Khodaei, Nastaran, & Tian, Feng. (2018). Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides from sucrose by endo-inulinase-catalyzed transfructosylation reaction in biphasic systems. *Process Biochemistry*, 69, 82-91.
- Kochhar, Anuradha, Gupta, Anil K, & Kaur, Narinder. (1999). Purification and immobilisation of inulinase from *Aspergillus candidus* for producing fructose. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(4), 549-554.
- Ku, MA, & Hang, YD. (1994). Effect of inulin on yeast inulinase production in sauerkraut brine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10(3), 354-355.
- Kurakake, Masahiro, Masumoto, RYO, Maguma, Kunihiro, Kamata, Akiko, Saito, Etsuko, Ukita, Norihiro, & Komaki, Toshiaki. (2010). Production of fructooligosaccharides by  $\beta$ -fructofuranosidases from *Aspergillus oryzae* KB. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(1), 488-492.
- Kushi, RT, Monti, Rubens, & Contiero, Jonas. (2000). Production, purification and characterization of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25(2), 63-69.
- Lachance, Marc-André. (2007). Current status of *Kluyveromyces* systematics. *FEMS yeast research*, 7(5), 642-645.
- Laemmli, Ulrich K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680-685.
- Lammens, Willem, Le Roy, Katrien, Van Laere, André, Rabijns, Anja, & Van den Ende, Wim. (2008). Crystal structures of *Arabidopsis thaliana* cell-wall invertase mutants in complex with sucrose. *Journal of Molecular Biology*, 377(2), 378-385.
- Lane, Melanie M, & Morrissey, John P. (2010). *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biology Reviews*, 24(1-2), 17-26.
- Li, Mengxi. (2014). *Levansucrase-catalyzed transfructosylation reaction: Novel biocatalytic approach for the production of fructooligosaccharides, oligolevans and levans using maple syrups as reaction media*. McGill University Montreal, Canada,

- Linde, Dolores, Rodríguez-Colinas, Barbara, Estévez, Marta, Poveda, Ana, Plou, Francisco J, & Lobato, María Fernández. (2012). Analysis of neofructooligosaccharides production mediated by the extracellular  $\beta$ -fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Bioresource technology*, 109, 123-130.
- Maiorano, Alfredo Eduardo, Piccoli, Rosane Moniz, Da Silva, Elda Sabino, & de Andrade Rodrigues, Maria Filomena. (2008). Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of pre-biotics. *Biotechnology letters*, 30(11), 1867-1877.
- Matthieu, Jean-Marie, & Quarles, Richard Hudson. (1973). Quantitative scanning of glycoproteins on polyacrylamide gels stained with periodic acid-Schiff reagent (PAS). *Analytical Biochemistry*, 55(1), 313-316.
- Méndez-Lorenzo, Luz, Porras-Domínguez, Jaime R, Raga-Carbajal, Enrique, Olvera, Clarita, Rodríguez-Alegría, Maria Elena, Carrillo-Nava, Ernesto, . . . López Munguía, Agustín. (2015). Intrinsic levanase activity of *Bacillus subtilis* 168 levansucrase (SacB). *PloS one*, 10(11), e0143394.
- Miller, Gail Lorenz. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Monsan, Pierre F, & Ouarné, Francois. (2009). Oligosaccharides derived from sucrose. In *Prebiotics and probiotics science and technology* (pp. 293-336): Springer.
- Mussatto, Solange I, & Mancilha, Ismael M. (2007). Non-digestible oligosaccharides: a review. *Carbohydrate polymers*, 68(3), 587-597.
- Mutanda, T, Wilhelmi, BS, & Whiteley, CG. (2008). Response surface methodology: synthesis of inulooligosaccharides with an endoinulinase from *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(4-5), 362-368.
- Nemukula, A, Mutanda, T, Wilhelmi, BS, & Whiteley, CG. (2009). Response surface methodology: synthesis of short chain fructooligosaccharides with a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. *Bioresource technology*, 100(6), 2040-2045.
- Olvera, Clarita, Centeno-Leija, Sara, Ruiz-Leyva, Paulina, & López-Munguía, Agustín. (2012). Design of chimeric levansucrases with improved transglycosylation activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6), 1820-1825.
- Ozimek, Lukasz K, Kralj, Slavko, Van der Maarel, Marc JEC, & Dijkhuizen, Lubbert. (2006). The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyse processive and non-processive transglycosylation reactions. *Microbiology*, 152(4), 1187-1196.
- Pandey, Ashok, Selvakumar, P, Soccol, Carlos R, & Nigam, Poonam. (1999). Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current science*, 149-162.
- Panesar, Parmjit S, Kumari, Shweta, & Panesar, Reeba. (2013). Biotechnological approaches for the production of prebiotics and their potential applications. *Critical reviews in biotechnology*, 33(4), 345-364.
- Panesar, PS, Bali, Vandana, Kumari, Shweta, Babbar, Neha, & Oberoi, Harinder Singh. (2014). Prebiotics. In *Biotransformation of waste biomass into high value biochemicals* (pp. 237-259): Springer.

- Pessoa Jr, Adalberto, & Vitolo, Michele. (1997). Separation of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using reversed micellar extraction. *Biotechnology techniques*, 11(6), 421-422.
- Plou, Francisco J, de Segura, Aránzazu Gómez, & Ballesteros, Antonio. (2007). Application of glycosidases and transglycosidases in the synthesis of oligosaccharides. In *Industrial enzymes* (pp. 141-157): Springer.
- Rastall, RA. (2010). Functional oligosaccharides: application and manufacture. *Annual review of food science and technology*, 1, 305-339.
- Raya-Chamol, Anahí Citllali. (2019). *Caracterización del crecimiento de Kluyveromyces marxianus AZ8 para la producción y purificación de la inulinasa ACh1* (Licenciatura), UNAM, México.
- Reddy, Anthony, & Maley, Frank. (1996). Studies on identifying the catalytic role of Glu-204 in the active site of yeast invertase. *Journal of Biological Chemistry*, 271(24), 13953-13958.
- Ricca, Emanuele, Calabrò, Vincenza, Curcio, Stefano, & Iorio, Gabriele. (2007). The state of the art in the production of fructose from inulin enzymatic hydrolysis. *Critical reviews in biotechnology*, 27(3), 129-145.
- Risso, Fernanda VA, Mazutti, Marcio A, Treichel, Helen, Costa, Fátima, Maugeri, Francisco, & Rodrigues, Maria Isabel. (2009). Comparison Between Systems for Synthesis of Fructooligosaccharides from Sucrose Using Free Inulinase.
- Risso, Fernanda VA, Mazutti, Marcio A, Treichel, Helen, Costa, Fátima, Maugeri, Francisco, & Rodrigues, Maria Isabel. (2010). METHODS: Synthesis of fructooligosaccharides from sucrose in aqueous & aqueous-organic systems using free inulinase from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045. *Industrial Biotechnology*, 6(5), 288-294.
- Risso, Fernanda VA, Mazutti, Marcio A, Treichel, Helen, Costa, Fátima, Maugeri, Francisco, & Rodrigues, Maria Isabel. (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, Marcel, & Slavin, Joanne. (2000). Nondigestible oligosaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.*, 40(6), 461-480.
- Rouwenhorst, ROBERT J, Hensing, Marco, Verbakel, J, Scheffers, W Alexander, & van Duken, JP. (1990). Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(11), 3337-3345.
- Sánchez, Oscar, Guio, Felipe, Garcia, Diana, Silva, Edelberto, & Caicedo, Luis. (2008). Fructooligosaccharides production by *Aspergillus* sp. N74 in a mechanically agitated airlift reactor. *food and bioproducts processing*, 86(2), 109-115.
- Sangeetha, PT, Ramesh, MN, & Prapulla, SG. (2005). Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. *Trends in food science & technology*, 16(10), 442-457.
- Santos, Andreina MP, & Maugeri, Francisco. (2007). Synthesis of fructooligosaccharides from sucrose using inulinase from *Kluyveromyces marxianus*. *Food Technology and Biotechnology*, 45(2), 181-186.

- Scholz-Ahrens, Katharina E, Ade, Peter, Marten, Berit, Weber, Petra, Timm, Wolfram, Açil, Yahya, . . . Schrezenmeir, Jürgen. (2007). Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure. *J Nutr*, 137(3), 838S-846S.
- Shrivastava, Smriti. (2020). Introduction to Glycoside Hydrolases: Classification, Identification and Occurrence. In *Industrial Applications of Glycoside Hydrolases* (pp. 3-84): Springer.
- Silva, Marcella Fernandes, Rigo, Diane, Mossi, Vinícius, Golunski, Simone, de Oliveira Kuhn, Graciele, Di Luccio, Marco, . . . Treichel, Helen. (2013). Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides by inulinases from *Aspergillus niger* and *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 in aqueous–organic medium. *Food chemistry*, 138(1), 148-153.
- Singh, Ram S, & Singh, Rupinder P. (2010). Production of fructooligosaccharides from inulin by endoinulinases and their prebiotic potential. *Food Technology and Biotechnology*, 48(4), 435.
- Singh, Ram Sarup, Singh, Rupinder Pal, & Kennedy, John F. (2016). Recent insights in enzymatic synthesis of fructooligosaccharides from inulin. *International journal of biological macromolecules*, 85, 565-572.
- Tazoe, H, Otomo, Y, Kaji, I, Tanaka, R, Karaki, SI, & Kuwahara, A. (2008). Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. *J Physiol Pharmacol*, 59(Suppl 2), 251-262.
- Trapala, Jonathan, Bustos-Jaimes, Ismael, Manzanares, Paloma, Bárzana, Eduardo, & Montiel, Carmina. (2020). Purification and characterization of an inulinase produced by a *Kluyveromyces marxianus* strain isolated from blue agave bagasse. *Protein Expression and Purification*, 176, 105718.
- Tzounis, Xenofon, Rodriguez-Mateos, Ana, Vulevic, Jelena, Gibson, Glenn R, Kwik-Uribe, Catherine, & Spencer, Jeremy PE. (2011). Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. *The American journal of clinical nutrition*, 93(1), 62-72.
- Van den Ende, Wim, Lammens, Willem, Van Laere, André, Schroeven, Lindsey, & Le Roy, Katrien. (2009). Donor and acceptor substrate selectivity among plant glycoside hydrolase family 32 enzymes. *The FEBS journal*, 276(20), 5788-5798.
- Van Loo, Jan, Coussement, Paul, De Leenheer, Leen, Hoebregs, Hubert, & Smits, Georges. (1995). On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 35(6), 525-552.
- Vandamme, Erick J, & Derycke, Dirk G. (1983). Microbial inulinases: fermentation process, properties, and applications. In *Advances in applied microbiology* (Vol. 29, pp. 139-176): Elsevier.
- Varzakas, Theodoros, Kandyli, Panagiotis, Dimitrellou, Dimitra, Salamoura, Chryssoula, Zakyntinos, George, & Proestos, Charalampos. (2018). Innovative and fortified food: Probiotics, prebiotics, gmos, and superfood. In *Preparation and Processing of Religious and Cultural Foods* (pp. 67-129): Elsevier.

- Vega, Roberto, & Zuniga-Hansen, ME. (2014). A new mechanism and kinetic model for the enzymatic synthesis of short-chain fructooligosaccharides from sucrose. *Biochemical Engineering Journal*, 82, 158-165.
- Wei, Wenling, Zheng, Zhonghui, Liu, Yueying, & Zhu, Xinsheng. (1998). Optimizing the culture conditions for higher inulinase production by *Kluyveromyces* sp. Y-85 and scaling-up fermentation. *Journal of fermentation and Bioengineering*, 86(4), 395-399.
- Yun, Jong Won. (1996). Fructooligosaccharides—occurrence, preparation, and application. *Enzyme and Microbial Technology*, 19(2), 107-117.
- Zittan, Lena. (1981). Enzymatic hydrolysis of inulin—an alternative way to fructose production. *Starch-Stärke*, 33(11), 373-377.

## ANEXOS

### **Anexo I .** Curva de calibración para la determinación del peso molecular (PM) mediante la técnica de cromatografía por exclusión molecular

A partir de los volúmenes de elución de las muestras estándar, junto al del azul de dextrano (volumen muerto), se puede calcular el factor  $K_a$ , el cual se expresa como:

$$K_a = \frac{(Volumen\ muestra\ estándar - Volumen\ muerto)}{(Volumen\ total - Volumen\ muerto)}$$

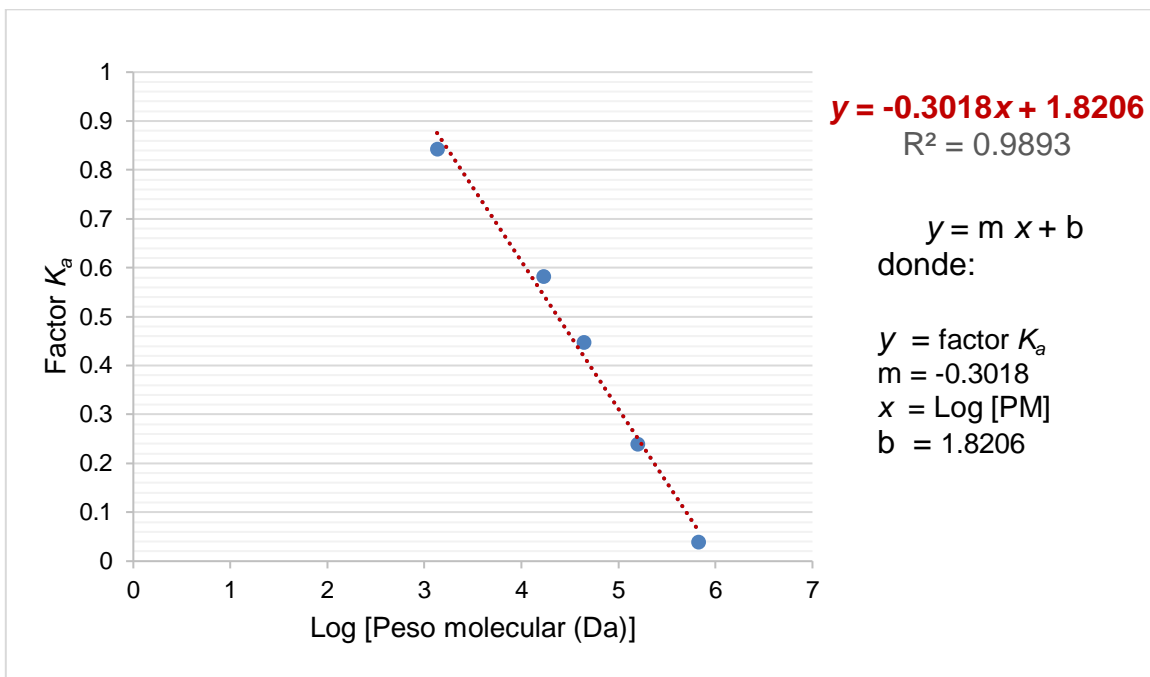
Valor que se reporta en la **Tabla III**:

**Tabla III.** Volúmenes de elución para la determinación del factor  $K_a$

Muestras estándar	Peso molecular (Da)	Volumen de elución (mL)	$K_a$	Log [Peso molecular] (Da)
Tiroglobulina (bovina)	670 000	10	0.0391	5.8261
$\gamma$ -globulina (bovina)	158 000	12.92	0.2395	5.1987
Ovoalbúmina (gallina)	44 000	15.95	0.4475	4.6435
Mioglobina (caballo)	17 000	17.92	0.5827	4.2304
Vitamina B12	1350	21.71	0.8428	3.1303
Azul de dextrano	2000	9.43		

A partir de la **Tabla III**, se trazó el gráfico del factor  $K_a$  vs Peso molecular (Da) en forma logarítmica Log(PM) para determinar la ecuación de la recta como se observa en la **Figura C**.





**Figura C.** Curva de calibración para la determinación del peso molecular (kDa). La línea roja punteada corresponde a la ecuación de la recta mostrada. Los datos de los estándares son mostrados con un punto azul.

### Ejemplo:

Volumen de elución experimental (mL)	$K_a$	Log [PM] (Da)	PM (Da)	PM (kDa)
13.97	0.3116	4.9983	99620.00	99.62