



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA INULINASA  
RECOMBINANTE DE *BACILLUS VELEZENSIS***

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERA QUÍMICA**

**PRESENTA**

**EDNA ALEJANDRA ORTIZ CASTAÑEDA**

**ASESORA**

**DRA. CARMINA MONTIEL PACHECO**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX**

**AÑO 2022**



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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: DRA. AMELIA MARÍA DE GUADALUPE FARRÉS GONZÁLEZ SARABIA**

**VOCAL: DRA. CARMINA MONTIEL PACHECO**

**SECRETARIO: DR. MANUEL GUTIÉRREZ AGUILAR**

**1er. SUPLENTE: DR. FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA**

**2° SUPLENTE: DR. MIQUEL GIMENO SECO**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 314 CONJUNTO E  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**ASESOR DEL TEMA: DRA. CARMINA MONTIEL PACHECO**

**SUPERVISOR TÉCNICO: JONATHAN TRAPALA REYNA**

**SUSTENTANTE: EDNA ALEJANDRA ORTIZ CASTAÑEDA**

## **AGRADECIMIENTOS**

A DGAPA UNAM por el financiamiento a través del proyecto PAPIIT IN219520

Facultad de Química PAIP 5000 9153

# Índice de contenido

1. Resumen.....	9
2. Marco teórico .....	10
2.1 Agave .....	10
2.1.1 <i>Distribución y taxonomía</i> .....	10
2.1.2 <i>Características</i> .....	10
2.1.3 <i>Composición de Agave tequilana weber variedad azul</i> .....	12
2.2 Inulina.....	13
2.2.1 <i>Fructanos</i> .....	13
2.2.2 <i>Estructura química y definición</i> .....	15
2.2.3 <i>Propiedades fisicoquímicas y aplicaciones</i> .....	15
2.2.4 <i>Ocurrencia en la naturaleza y extracción</i> .....	16
2.2.5 <i>Hidrólisis de inulina</i> .....	16
2.3 Inulinasas.....	18
2.3.1 <i>Principales fuentes de inulinasas</i> .....	18
2.3.2 <i>Características de las inulinasas</i> .....	19
2.3.3. <i>Estructura tridimensional y sitio activo</i> .....	20
2.3.4 <i>pH y temperatura óptimos</i> .....	23
2.4 <i>Bacillus velezensis</i> .....	24
3. Justificación.....	25
4. Hipótesis.....	27
5. Objetivos .....	27
5.1 <i>Objetivo general</i> .....	27
5.2 <i>Objetivos particulares</i> .....	27
6. Materiales y Métodos.....	27
6.1 <i>Materiales</i> .....	27

6.2 Metodología .....	29
6.3 Crecimiento del cultivo <i>E. coli</i> .....	30
6.4 Extracción de DNA .....	30
6.5 Digestión enzimática .....	30
6.6 Electroforesis en gel de agarosa al 1 %.....	31
6.7 Inducción de la expresión.....	31
6.8 Gel de acrilamida SDS-PAGE .....	32
6.9 Ruptura celular .....	33
6.10 Purificación inulinasa recombinante por cromatografía de afinidad en columna de Níquel .....	33
6.11 Purificación inulinasa recombinante por cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC) – Cromatografía de afinidad .....	34
6.12 Diálisis.....	35
6.13 Liofilización.....	35
6.14 Cuantificación de azúcares reductores por DNS .....	35
6.15 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática .....	36
6.16 Efecto del pH sobre la actividad enzimática .....	36
6.17 Efecto del tipo de sustrato sobre la actividad enzimática .....	37
6.18 Cuantificación de proteína por método de Bradford .....	37
7. Resultados .....	38
7.1 Purificación del DNA plasmídico.....	38
7.2 Inducción de la inulinasa recombinante .....	39
7.3 Purificación .....	42
7.3.1 Cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad.....	45
7.4 Evaluación de la actividad enzimática a diferentes condiciones de temperatura ....	47
7.5 Evaluación de la actividad enzimática a diferentes condiciones de pH .....	48
7.6 Evaluación de la actividad enzimática con diferentes sustratos .....	49

<b>8. Conclusiones</b> .....	50
<b>9. Perspectivas</b> .....	51
<b>10. Referencias</b> .....	51
<b>Anexos</b> .....	56

## Índice de tablas y figuras

Figura 1.....	11
Figura 2.....	12
Tabla 1.....	12
Tabla 2.....	13
Figura 3.....	14
Figura 4.....	14
Tabla 3.....	16
Tabla 4.....	17
Tabla 5.....	18
Figura 5.....	20
Figura 6.....	21
Figura 7.....	21
Figura 8.....	21
Figura 9.....	22
Figura 10.....	23
Tabla 6.....	23
Figura 11.....	24
Figura 12.....	25
Tabla 7.....	32
Figura 13.....	38
Figura 14.....	39
Figura 15.....	40
Tabla 8.....	40
Figura 16.....	41
Tabla 9.....	41
Figura 17.....	42

Figura 18.....	43
Tabla 10.....	43
Tabla 11.....	44
Figura 19.....	44
Tabla 12.....	44
Figura 20.....	45
Figura 21.....	46
Figura 22.....	47
Tabla 13.....	47
Tabla 14.....	47
Figura 23.....	48
Figura 24.....	49
Tabla 15.....	50
Figura 25.....	50
Tabla 16.....	60
Figura 26.....	60
Figura 27.....	61

## 1. Resumen

Los principales compuestos presentes en las hojas de agave son polisacáridos, usualmente del tipo inulina, que son polímeros de fructosa unidos por enlaces  $\beta$ -(2-1). La hidrólisis enzimática de estos compuestos produce oligómeros llamados fructooligosacáridos (FOS) que funcionan como prebióticos, siendo potentes estimuladores de la microbiota intestinal benéfica. Así mismo, la inulina puede ser empleada en la producción de fructosa a partir de su hidrólisis. Entre los usos más significativos de la fructosa a nivel industrial se encuentran la obtención de jarabes de alta fructosa y también se puede utilizar en la producción de etanol e incluso de bioplásticos.

Una manera de producir oligosacáridos o fructosa a partir de la inulina es mediante la hidrólisis de ésta. La hidrólisis se puede llevar a cabo a través de la ruta enzimática, utilizando inulinasas, ya sea con actividad endo o exo. Las endoinulinasas hidrolizan los enlaces internos de la inulina para producir FOS, mientras que las exoinulinasas rompen los enlaces externos de la molécula para producir fructosa. Ambas enzimas reconocen los enlaces  $\beta$ -(2-1) y en algunos casos los enlaces  $\beta$ -(2-6).

Las inulinasas son producidas por una gran cantidad de organismos, incluyendo hongos, levaduras, plantas y bacterias. Las bacterias son un amplio género de microorganismos poco estudiados capaces de producir estas enzimas. En nuestro grupo de trabajo contamos con una cepa de *Bacillus velezensis*, aislada de bagazo de agave, capaz de producir enzimas hidrolíticas, entre ellas una inulinasa capaz de hidrolizar a la inulina de agave. Esta enzima ha sido clonada y expresada en *Escherichia coli*. El objetivo principal de este trabajo es estudiar a la enzima y establecer cuáles son las mejores condiciones para producirla. Para ello se empleó la enzima recombinante previamente desarrollada en el grupo de trabajo. Una vez confirmado que el plásmido pET28b+ con el gen de la inulinasa se encontraba viable en las células, se determinaron las mejores condiciones de expresión de la proteína, así como el mejor procedimiento para su purificación. Una vez purificada la enzima, esta se caracterizó para establecer las mejores condiciones de pH, temperatura y preferencia por el sustrato, con la finalidad de determinar si la enzima es una inulinasa.

## **2. Marco teórico**

### **2.1 Agave**

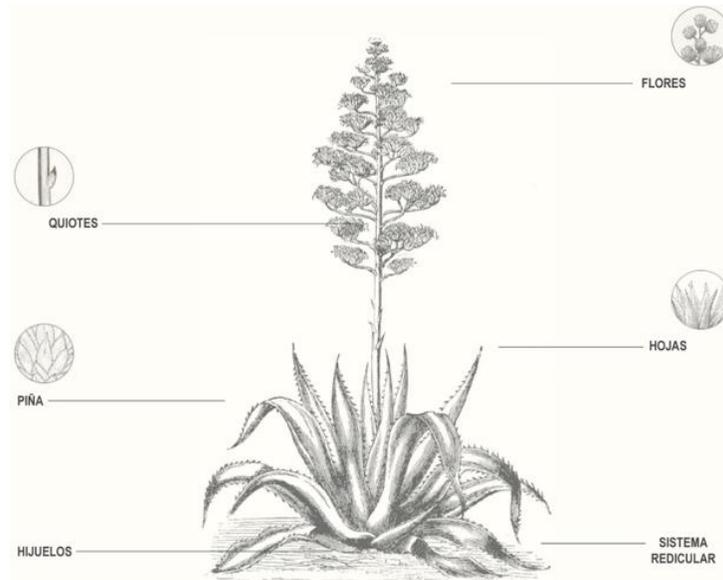
#### **2.1.1 Distribución y taxonomía**

El género *Agave* (*Agavaceae*) es una monocotiledónea endémica del continente americano, con una distribución desde el sur de los Estados Unidos hasta Colombia y Venezuela (García-Mendoza, 2002). La cantidad de especies presentes en territorio mexicano de este género varían dependiendo de la delimitación taxonómica del género. Sin embargo, es posible considerar un aproximado de 150 especies, además de 36 taxones infra específicos, teniendo un total de 186 taxones. Esto representa el 75 % del total de especies conocidas alrededor del mundo, el 55 % de las cuales son endémicas (García-Herrera, 2010).

Los diferentes tipos de agave pueden encontrarse a una altura que va desde el nivel del mar hasta 3400 metros, aunque normalmente se ubican entre los 1000 y 2000 metros. Esta planta puede ubicarse en planicies, acantilados, montañas dunas o picos montañosos. El número de especies propias de cada rango altitudinal disminuye al aumentar la altitud (García-Mendoza, 2002).

#### **2.1.2 Características**

La utilización del agave, también conocido como *maguey*, data de épocas precolombinas. Se trata de una planta monocárpica, ya que florece una vez en su vida y posteriormente muere. Las plantas de agave están compuestas principalmente de dos partes: hojas largas con espinas y una parte llamada "piña". Con sus hojas (pencas), adquiere una forma similar a la de una roseta, sus pencas son verdes, gruesas y carnosas, y terminan con una punta afilada. Poseen raíces ramificadas, cutícula gruesa, hojas suculentas con estomas hundidos (Figura 1) y metabolismo fotosintético tipo CAM (Metabolismo Ácido Crasuláceo) (Huerta *et al.*, 2014).

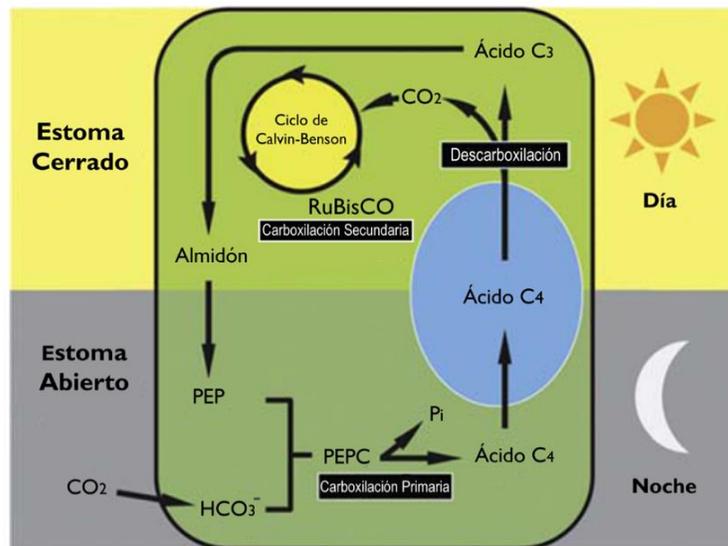


**Figura 1.** Anatomía de la planta de agave (Tomada y traducida de Great Agave, s.f.).

El CAM es un ejemplo de adaptación al estrés ambiental y se presenta en plantas de sitios con periodos de escasa disponibilidad de agua o de CO<sub>2</sub>. Este tipo de fotosíntesis es uno de los tres encontrados en los tejidos de las plantas vasculares para la asimilación de CO<sub>2</sub> de la atmósfera. (Taiz y Zeiger, 2002).

En la fotosíntesis tipo CAM, parte, o todo, el proceso de asimilación del CO<sub>2</sub> atmosférico es movido temporalmente a la fase oscura. En esta fase, el CO<sub>2</sub> es fijado vía fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), cuyo precursor, el fosfoenolpiruvato (PEP), se genera durante la glucólisis. El ácido málico formado se almacena en la vacuola central. Algunas plantas CAM también forman ácido cítrico.

En el periodo luminoso, el ácido orgánico es removido de la vacuola y descarboxilado. El CO<sub>2</sub> regenerado es fijado nuevamente por la enzima ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO), y es asimilado en el ciclo de Calvin. Los carbohidratos, usados tanto como producto fotosintético para la formación de nueva biomasa, así como fuente para el PEP como precursor en la fijación de CO<sub>2</sub>, son formados en la fotosíntesis vía gluconeogénesis (Figura 2) (Borland *et al.*, 2014).



**Figura 2.** Diagrama simplificado del flujo de carbono en la fotosíntesis CAM en plantas (Tomado y traducido de Borland *et al.*, 2014).

### 2.1.3 Composición de *Agave tequilana weber* variedad azul

El maguey tiene una composición general de un 60 % de humedad, 25 % carbohidratos, 10 % fibra y médula, 2.5 % sales minerales y 2.5 % de otros componentes incluidas proteínas e inulinas (Huerta *et al.*, 2014). El principal carbohidrato complejo presente en el agave es la inulina, un polímero de fructosa con un residuo terminal de glucosa (Bautista *et al.*, 2001).

El *Agave tequilana Weber variedad azul* es la especie de *Agave* con más relevancia en el ámbito económico del país. Es una planta xerófila de hojas color azul verdoso, delgadas y casi planas; mide aproximadamente 1.25 metros de largo y 10 centímetros de ancho y tiene una espina terminal de color rojo oscuro de 2 centímetros. La composición general y de carbohidratos se muestra en la tabla 1 y 2 (Granados, 1993). Dependiendo de las condiciones climáticas, estas plantas alcanzan su madurez en un periodo de seis a diez años (Guzmán, 1997).

**Tabla 1.** Composición de las diferentes fracciones de *Agave tequilana Weber* variedad azul, en % en base húmeda (Montañez *et al.*, 2011).

	Punta de hoja	Base de hoja	Cabeza
Humedad	81.13	79.41	71.10
Cenizas	2.68	1.76	1.16
Lípidos	0.26	0.12	0.10
Proteínas	0.96	0.64	0.62
Fibra Cruda	9.86	6.24	4.00
Carbohidratos	5.11	11.83	23.02

**Tabla 2.** Composición de carbohidratos en *Agave tequilana* Weber variedad azul. Contenido en materia fresca (g/100 g) (Praznik *et al.*, 2003).

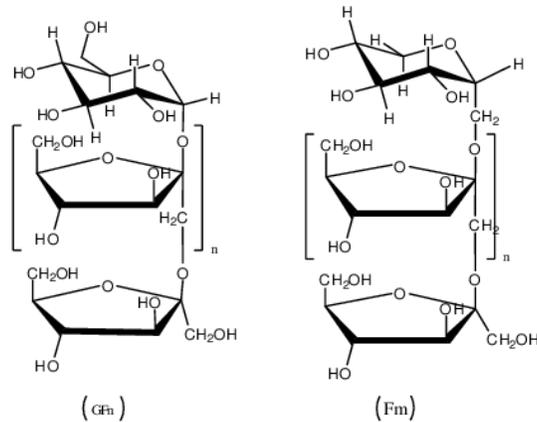
	Piña y base de la penca	Penca, zona media
Materia seca	31.5	19
Monosacáridos (Glu, Fru)	Ausentes	0.5
Sacarosa	0.2	0.8
Fructanos DP 3 – 10	9.9	4.9
Fructanos DP >10	4.4	2.4

## 2.2 Inulina

### 2.2.1 Fructanos

El principal carbohidrato presente en el agave es la inulina. Este compuesto fue descubierto a inicios de los años 1800 por un científico alemán llamado Valentine Rose, quien la encontró en las raíces de Elecampana (*Inula helenium*) y fue posteriormente nombrada *inulina*. La inulina es un polisacárido soluble en agua que pertenece a la familia de carbohidratos no digeribles denominados *fructanos*. Los fructanos son una categoría de compuestos que incluye a todos los oligo y polisacáridos naturales en los que una o más uniones fructosil-fructosa componen la mayoría de los enlaces glucosídicos. Por lo tanto, se trata de polímeros constituidos principalmente por unidades de fructosa. Los fructanos pueden tener al menos un enlace fructosil-glucosa, idéntico al encontrado en la sacarosa que, cuando está presente, es típicamente un eslabón de partida en la cadena polimérica (Kelly, 2008).

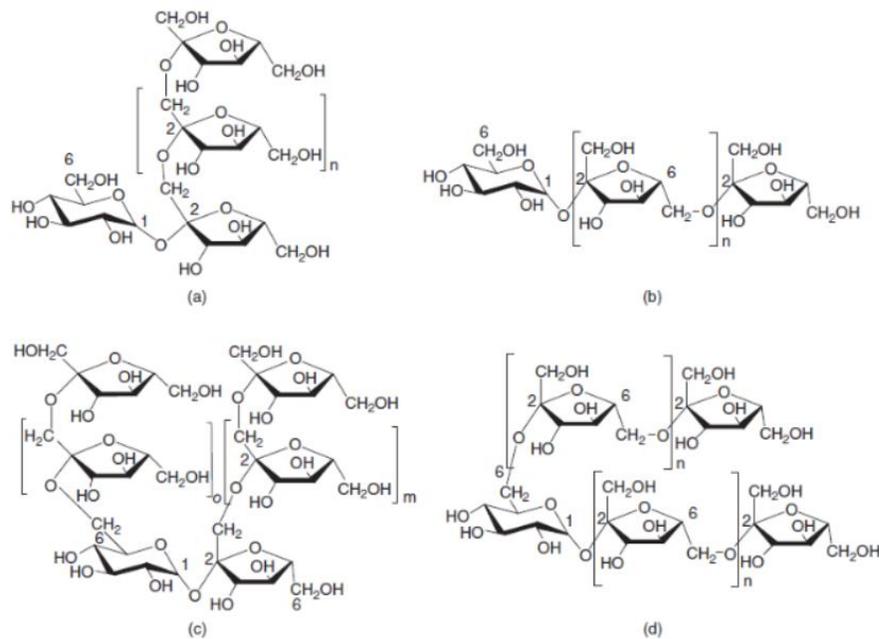
Un fructano con una molécula de glucosa precedente a una de fructosa es designado como GF<sub>n</sub>; donde G se refiere a la unidad de glucosa terminal, F a las unidades de fructosa y n designa el número de monómeros de fructosa encontrados en la cadena. Cuando la cadena no tiene una glucosa inicial se identifica como F<sub>n</sub> o F<sub>m</sub>. Ambos son usados en la literatura, donde n o m hacen referencia al número de unidades de fructosa en el polímero (Figura 3).



**Figura 3.** Estructura química de un fructano GF<sub>n</sub> (izquierda) y F<sub>m</sub> (derecha) (Dawei, 2019).

Los fructanos también pueden ser descritos por su grado de polimerización (DP, por sus siglas en inglés). El DP hace referencia al número de unidades repetidas en un oligómero o cadena polimérica, por lo que para un fructano sería el número de moléculas de fructosa presentes, igual a n (Kelly, 2008).

Existen dos clases estructurales de fructanos: inulinas y levanos. Sin embargo, existen 4 más que podrían denominarse subcategorías: neoserias, tanto de inulinas como de levanos, graminianos y agavinas (Figura 4) (Kelly, 2008).



**Figura 4.** Estructura de fructanos tipo (a) inulina, (b) levano, (c) neo-inulina y (d) neo-levano (Arrizón et al., 2014).

Los levanos, al igual que las inulinas, son polímeros lineales que consisten en residuos de fructofuranosa unidos por enlaces  $\beta$ -(2→6) con un residuo de glucopiranososa terminal (Figura 4) (Tian, 2013). Su DP es muy diverso dependiendo de la fuente, yendo desde menos de 150 hasta 10,000 en levanos provenientes de bacterias como *Zymomonas mobilis* (Anderson *et al.*, 2004).

Los fructanos conocidos como neo-series, ya sean de inulina o levano dependiendo del tipo de enlace entre los residuos de fructofuranosa, se encuentran comúnmente en especies de las familias *Allinaceae* y *Asparagaceae*, *Agavaceae* como en cebolla, espárrago y agave (Ulloa *et al.*, 2010).

### **2.2.2 Estructura química y definición**

El DP y las ramificaciones tienen un efecto en la funcionalidad de la inulina. La inulina proveniente de plantas tiene un grado de polimerización relativamente bajo (máximo < 200), lo que depende de la especie de la planta, las condiciones climáticas y las condiciones físicas de la planta (Chi *et al.*, 2009).

La mayoría de las inulinas son lineales. Sin embargo, algunas inulinas vegetales, como es el caso de la inulina proveniente del agave, conocida como agavina, tienen ramificaciones conectadas por enlaces  $\beta$ -(2→6) (López *et al.*, 2003), cuyo origen aún es desconocido. Los fructanos de tipo inulina pueden ser divididos en fructooligosacáridos cuando su DP es menor o igual a 10 y en inulina, cuando su DP es mayor a 10 (Morris y Morris, 2012).

### **2.2.3 Propiedades fisicoquímicas y aplicaciones**

La inulina ha sido categorizada como “Reconocida Generalmente como Segura” (GRAS por sus siglas en inglés) para su uso desde 2002. Debido a que los enlaces  $\beta$ -(2→1) de la inulina no pueden ser hidrolizados por enzimas secretadas por el cuerpo humano, las cuales son específicas para enlaces  $\alpha$ , sólo pueden ser fermentadas por bacterias en el colon. Gracias a esto la inulina es considerada una fibra dietética y cuenta con funciones prebióticas (Roberfroid y Slavin, 2000).

Su bajo contenido calórico (1.5 kcal/g, Roberfroid, 1999) se debe a que es no digerible, en contraste con los residuos monosacáridos que la constituyen. Debido a la acción de las bacterias intestinales, la inulina es transformada en ácidos grasos de cadena corta (como acetato, propionato y butirato), lactato, combustible bacteriano y gases (Nyman, 2002).

### 2.2.4 Ocurrencia en la naturaleza y extracción

La inulina es abundante en plantas, particularmente en la familia *Compositae* (Flores *et al.*, 2016). Existen aproximadamente 36,000 especies diferentes de plantas que contienen fructanos como carbohidratos de reserva. Otras de las principales familias de plantas que incluyen fructanos en su composición son *Liliaceae*, *Amarillydaceae*, *Gramineae*, *Poaceae* y *Solanaceae* (Tabla 3) (Chacón, 2006). El origen de las inulinas es principalmente vegetal, sin embargo, existen fructanos provenientes de organismos como bacterias y hongos.

**Tabla 3.** Contenido aproximado de fructanos en diversas especies vegetales (Van Loo *et al.*, 1995).

Planta	Fructanos (% en producto seco)
Achicoria ( <i>Cichorium intybus</i> )	16-25
Name ( <i>Dioscorea</i> sp.)	19-20
Topinambur o papa de Jerusalén ( <i>Helianthus tuberosus</i> )	14-19
Agave ( <i>Agave</i> sp.)	13-17
Diente de león ( <i>Taraxacum officinale</i> )	12-15
Ajo común ( <i>Allium sativum</i> )	9-16
Yacón ( <i>Smallanthus sonchifolius</i> )	3-19
Alcachofa ( <i>Cyanara scolymus</i> )	3-10
Puerro ( <i>Allium porrum</i> )	3-10
Cebolla ( <i>Allium cepa</i> )	2-6
Espárrago ( <i>Asparagus affincinalis</i> )	2-3

La inulina extraída para su uso comercial proviene principalmente de la raíz de la achicoria por su alto contenido. Ésta es una planta que crece dos veces al año perteneciente a la familia *Asteraceae* (Boeckner *et al.*, 2001).

### 2.2.5 Hidrólisis de inulina

Debido a las ventajas que presentan la fructosa y los FOS de bajo DP, la industria hoy en día utiliza ácido o enzimas para hidrolizar a la inulina y obtener productos de valor agregado con un rango definido de DP y propiedades específicas (Laurenzo *et al.*, 1999). Otras técnicas como la hidrólisis en resinas de intercambio iónico u otros catalizadores también han sido probados (Blecker *et al.*, 2002).

Muchos estudios de investigación se han centrado en la hidrólisis completa de la inulina en sus dos monómeros constitutivos, glucosa y fructosa, para la preparación de jarabes de alta fructosa y con especial cuidado en evitar la formación de subproductos (Blecker *et al.*, 2002; Rocha, *et al.*, 2006; Liu, *et al.*, 2010).

### 2.2.5.1 Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida de inulina ha sido estudiada utilizando principalmente ácido sulfúrico o clorhídrico, además de algunos ácidos orgánicos. Las condiciones de hidrólisis son variables, con valores de pH en el rango de 1 - 4 y de temperatura de 60 a 100 °C, con un tiempo de duración que va de los cinco minutos hasta varias horas (Pekić *et al.*, 1985).

Las condiciones drásticas como un pH bajo y alta temperatura pueden disminuir el tiempo de hidrólisis y llegar a la hidrólisis completa del sustrato. Sin embargo, tienen una influencia negativa en el rendimiento del producto final debido a la sensibilidad de pH-temperatura de la molécula de fructosa, además de la formación de subproductos en forma de anhídros de difructosa (Blecker *et al.*, 2002).

En comparación con la hidrólisis enzimática, este proceso tiene un costo más bajo y procede de manera más rápida. No obstante, también tiene grandes desventajas como la coloración del hidrolizado de inulina y la formación de subproductos (Gill *et al.*, 2006).

### 2.2.5.2 Hidrólisis enzimática

La enzima que hidroliza los enlaces  $\beta$ -(2→1) de la inulina es conocida como *inulinasa* (EC 3.2.1.7). Las inulinasas pueden obtenerse de plantas y muchos microorganismos. Se ha comprobado que plantas como el diente de león, la achicoria y la alcachofa de Jerusalén contienen inulinasas que pueden ser extraídas y purificadas. Sin embargo, los vegetales resultan no ser fuentes tan productivas como aquellas provenientes de microorganismos (Tabla 4) (Kochhar *et al.*, 1999).

**Tabla 4.** Diferencias y similitudes entre las inulinasas provenientes de plantas y de microorganismos. Información reunida de Van den Ende *et al.*, 2004.

Inulinasas		
Origen	Plantas	Microbianas
Características	Exohidrolasas	Exo y endohidrolasas
	No son capaces de degradar sacarosa	La mayoría son capaces de degradar sacarosa
	Pertenecen a la familia GH32	Pertenecen a la familia GH32
Actividad [U/mL]	<b>1.3 x10<sup>-3</sup> - 0.26 x10<sup>-3</sup></b> Hidrolasas provenientes de raíces de diente de león (Rutherford y Deacon, 1971)	<b>75</b> Inulinasa de <i>Aspergillus</i> sp. (Pandey <i>et al.</i> , 1999)

El uso de las inulinasas ha permitido la obtención de jarabes de fructosa puros a través de un proceso enzimático de un solo paso, en lugar de la utilización de hidrólisis ácida. Dado que la inulina tiene una baja solubilidad y alta capacidad de contaminación microbiana en agua a temperatura ambiente. Esto provoca que su hidrólisis a nivel industrial deba llevarse a cabo a temperaturas mayores, además de que esto permite el uso de concentraciones mayores de inulina debido al aumento de la solubilidad. Por lo tanto, las inulinasas termoestables son la mejor opción para el rompimiento de este sustrato.

## 2.3 Inulinasas

### 2.3.1 Principales fuentes de inulinasas

Las inulinasas microbianas son parte de una importante clase de enzimas industriales que han recibido gran atención en los últimos años. Estas enzimas pueden ser producidas por una amplia variedad de microorganismos como; hongos, levaduras y bacterias. Siendo los hongos y levaduras los más productivos (Tabla 5).

Lo que distingue a las enzimas producidas por diferentes microorganismos es el rendimiento de enzima obtenido y las propiedades de cada una, las cuales dependen no sólo del organismo del cual se obtiene, sino de la forma de fermentación que se lleva a cabo y el sustrato hidrolizado. Los microorganismos más utilizados son cepas de hongos pertenecientes al género *Aspergillus* y levaduras del género *Kluyveromyces*.

**Tabla 5.** Rendimiento de inulinasas provenientes de diferentes microorganismos. Datos marcados con \* están expresados en U/g.

Microorganismo	Rendimiento enzimático (U/mL)	Referencias
<b>HONGOS</b>		
<i>Aspergillus sp.</i>	75	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>Aspergillus ficuum</i> JNSP 5-06	25	Jing <i>et al.</i> , 2003
<i>Aspergillus niger</i> SL 09	118	Zhang <i>et al.</i> , 2004
<i>Aspergillus niger</i> AUP19	176	Kumar <i>et al.</i> , 2005
<i>Aspergillus mutant 817</i>	160	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>Penicillium sp.</i> TN88	9.9	Nakamura <i>et al.</i> , 1997
<b>BACTERIAS</b>		
<i>Bacillus sp.</i>	5.14	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>Bacillus subtilis</i> 430 A	50 - 70	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>Bacillus smithii</i> T7	135.2	Gao <i>et al.</i> , 2009
<i>Clostridium acetobutylicum</i> IFP 912	43.7	Pandey <i>et al.</i> , 1999

<i>Streptomyces</i> sp. ALKC4	9400*	Sharma & Gill, 2007
<i>Streptomyces</i> sp. GNDU-1	0.552	Gill <i>et al.</i> , 2003
<i>Xanthomonas</i> sp.	15	Park & Yun, 2001
<b>LEVADURAS</b>		
<i>Cryptococcus pseudotropicalis</i> IP513	25000*	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>Cryptococcus aureus</i>	85	Sheng <i>et al.</i> , 2007
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556	58000*	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	1317	Treichel <i>et al.</i> , 2009
<i>K. fragilis</i> ATCC 12424	355	Pandey <i>et al.</i> , 1999
<i>Pichia guilliermondii</i>	60	Gong <i>et al.</i> , 2007

Las bacterias no presentan rendimientos equiparables a los hongos o levaduras, no obstante, su naturaleza termofílica es una gran ventaja ya que permiten incrementar la temperatura de la reacción (Pandey *et al.*, 1999).

La mayor efectividad con respecto al sustrato se observa cuando se trata de inulina, mientras que la sacarosa ha exhibido un efecto inhibitorio en la producción de la inulinasa. Esta afirmación, sin embargo, solo es verdadera cuando la enzima no tiene actividad invertasa. De otro modo, la presencia de la sacarosa puede mejorar el rendimiento de la enzima en el cultivo (Vandamme y Derycke, 1983).

La mayoría de las enzimas de origen microbiano son extracelulares, mientras que aquellas producidas por levaduras se presentan dentro y fuera de la pared celular (Pandey *et al.*, 1999).

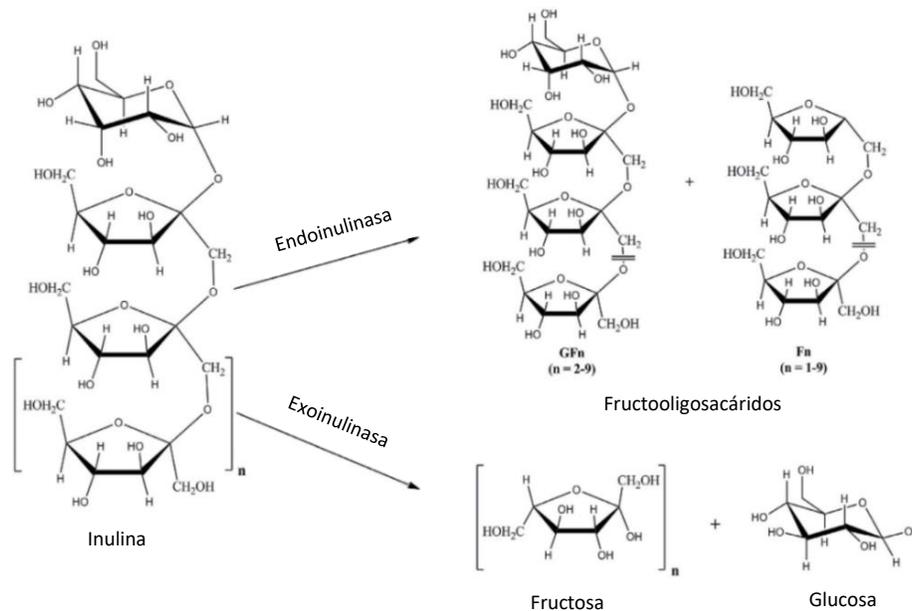
### **2.3.2 Características de las inulinasas**

Las inulinasas son enzimas que necesitan de un inductor para su síntesis. La inulina es considerada como la mejor fuente de carbono para los microorganismos productores de estas enzimas, además de actuar como inductor (Singh *et al.* 2017). Se encuentran clasificadas dentro de la familia 32 perteneciente a las glicosil hidrolasas (EC 3.2.1.x), de acuerdo con la clasificación CAZy (Enzimas Activas en Carbohidratos, por sus siglas en inglés) (Lammens, *et al.* 2009). A su vez, esta familia es parte del clan de enzimas GH-J, del que forman parte hidrolasas y fructosiltransferasas.

Las inulinasas atacan el enlace  $\beta$ -(2→1) de la inulina, hidrolizándolo en fructosa o fructooligosacáridos (Figura 5). Se pueden dividir en exoinulinasas y endoinulinasas. Las exoinulinasas catalizan la remoción de los residuos de fructosa terminal del extremo no reductor

de la molécula de inulina, mientras que las endoinulinasas hidrolizan los enlaces internos de la inulina arbitrariamente para obtener fructooligosacáridos de diferente longitud de cadena (Chi *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2017).

Las exoinulinasas también pueden poseer actividad de invertasa (EC 3.2.1.26), pues es capaz de hidrolizar a la sacarosa. Un único sitio activo de la enzima es responsable de la hidrólisis de sacarosa, así como de la de los fructanos. Las endoinulinasas no tienen actividad invertasa (Singh *et al.*, 2017).

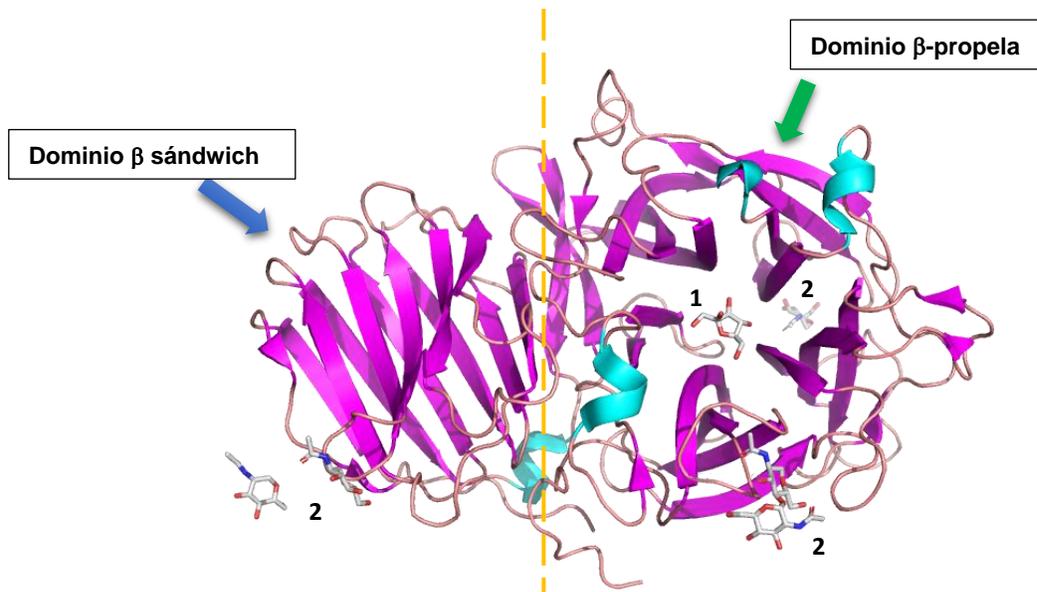


**Figura 5.** Degradación de la inulina por medio de inulinasas (Lammens *et al.* 2009).

### 2.3.3. Estructura tridimensional y sitio activo

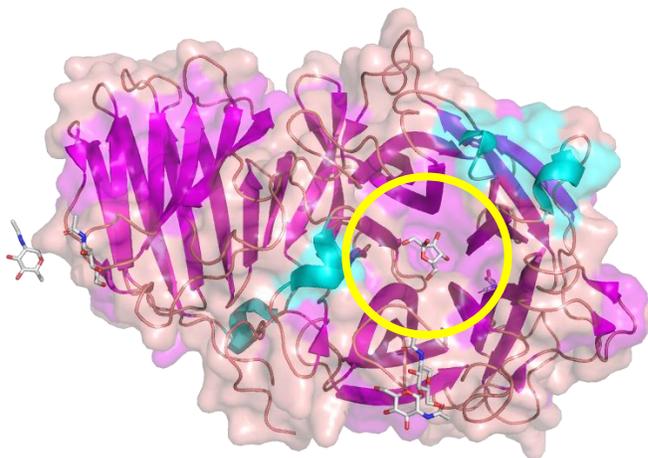
Las enzimas pertenecientes al clan GH-J tienen un dominio catalítico  $\beta$ -propela con tres aminoácidos conservados, dos residuos de ácido aspártico y un residuo de ácido glutámico, localizados en la zona axial profunda de la cavidad catalítica. La propela cuenta con cinco láminas  $\beta$  conformadas a su vez por cuatro cadenas  $\beta$  antiparalelas alrededor del eje central, encerrando la cavidad cargada negativamente del sitio activo (Figura 6) (Lammens *et al.* 2009).

Los miembros de la familia GH32 típicamente contienen un dominio en el extremo C-terminal compuesto por dos láminas  $\beta$  de seis cadenas antiparalelas formando una estructura de  $\beta$  sándwich, la cual se cree que ayuda en la estabilidad de la proteína (Figura 6) (Altenbach *et al.* 2004).

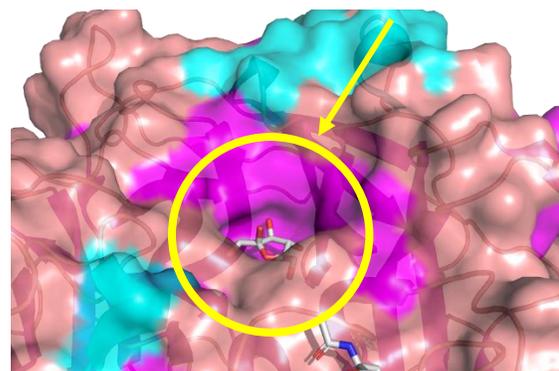


**Figura 6.** Estructura terciaria de una exoinulinasa de *Aspergillus awamori*. Las estructuras de hojas beta se encuentran coloreadas en magenta y las hélices alfa en cian. El dominio  $\beta$  sándwich se encuentra señalado con una flecha azul, mientras que el  $\beta$ -propela se encuentra señalado por una flecha verde. Ambos dominios se encuentran separados por una línea punteada. Los ligandos presentes son (1) fructosa y (2) n-acetil-d-glucosamina (NAG). Código PDB: exoinulinasa 1Y9G.

Entre ambos dominios se forma una hendidura, la cual se ha propuesto que puede ayudar en el reconocimiento de sustratos fructanos con valores más altos de DP.

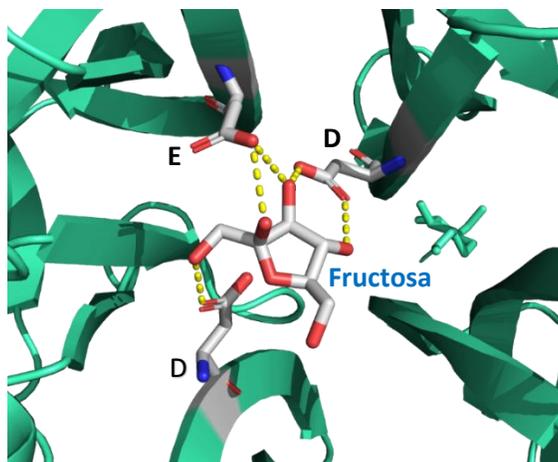


**Figura 7.** Estructura terciaria de exoinulinasa de *Aspergillus awamori* con superficie, señalando el pocket catalítico de la enzima. Código PDB 1Y9G.



**Figura 8.** Estructura terciaria de exoinulinasa de *Aspergillus awamori* con superficie, señalando el sitio activo de la enzima donde se encuentra una molécula de fructosa. Código PDB 1Y9G.

La triada catalítica que conforma el sitio activo de las inulinasas se encuentra en el dominio  $\beta$ -propela (Figura 7 Y 8), específicamente en los motivos conservados WMNDPNG, EC Y RDP, en donde el ácido aspártico (D) en el motivo WMNDPNG, actúa como un nucleófilo; el ácido aspártico (D) en el motivo RPD, tiene la función de estabilizar r del estado de transición; y finalmente, el ácido glutámico (E) presente en el motivo EC, es el catalizador ácido/base (Figura 9) (Altenbach *et al.* 2004).



**Figura 9.** Triada catalítica de la exoinulinasa de *Aspergillus awamori* y su unión con la fructosa (PDB 1Y9G).

### **2.3.3.1 Mecanismo de reacción**

En el primer paso de la reacción o glicosilación de la hidrólisis llevada a cabo por las inulinasas, ocurre un ataque nucleofílico en el carbono anomérico del sustrato hecho por el carboxilato del nucleófilo (D), formando un intermediario fructosa-enzima unido covalentemente. El catalizador ácido/base (E) actúa como un ácido, donando un protón al grupo saliente glicosil. En el segundo paso, la deglicosilación, el catalizador ahora actúa como una base, tomando un protón del grupo fructosil entrante, lo que hidroliza al intermediario fructosa-enzima (Figura 10) (Lee *et al.*, 2003).



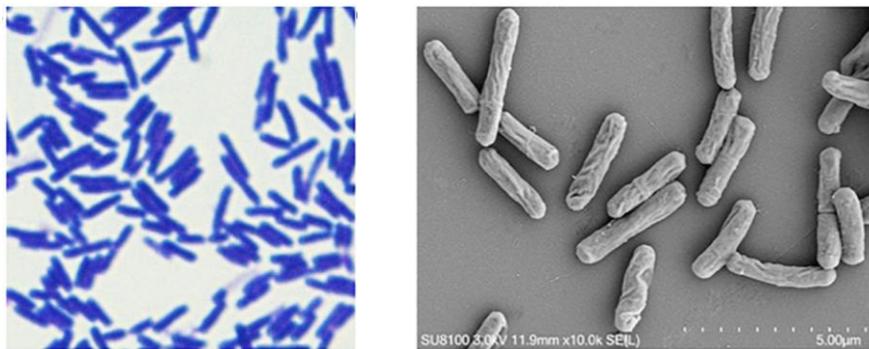
## 2.4 *Bacillus velezensis*

*Bacillus* es un género amplio de bacterias Gram positivas conformado por especies aeróbicas o anaeróbicas facultativas, con morfología bacilar, movilidad flagelar y de tamaño variable (0.5 a 10  $\mu\text{m}$ ). Crecen en condiciones neutras de pH y cuentan con un extenso intervalo de temperaturas de crecimiento, sin embargo, la mayoría de las especies son mesófilas, creciendo dentro de un intervalo de temperatura entre 30 y 45 °C. Su capacidad para producir endosporas les confiere a las especies de este género una gran capacidad de diseminación y prevalencia en diferentes ecosistemas.

*Bacillus amyloliquefaciens* es una bacteria responsable de la mayor parte de la producción de  $\alpha$ -amilasa y proteasa en el mundo (Priest *et al.*, 1987). Fue aislada en 1943 por el científico japonés Fukumoto y colaboradores, y posteriormente agrupada con *B. licheniformis*, *B. pumilus* y *B. subtilis* dentro del “Complejo de especies *B. subtilis*”, basándose en evidencia filogenética y fenética (Fazle Rabbee, *et al.*, 2019).

Por otro lado, *Bacillus velezensis* (Figura 11) fue aislada por primera vez a partir de muestras tomadas de la boca del río Vélez en Torredelmar, en la provincia de Málaga, España (Ruiz-García *et al.*, 2005). Es una bacteria aeróbica, Gram-positiva, que forma endosporas y se ha reportado en la literatura que promueve el crecimiento de plantas (Fazle Rabbee, *et al.*, 2019). Se encontró que las cepas aisladas de *B. velezensis* estaban estrechamente relacionadas con *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*.

En 2011, tomando como base un análisis del genoma completo, las cepas de *B. amyloliquefaciens* se dividieron en dos subespecies, *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* y *B. amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum*, que es como también se le conoce a *B. velezensis*.



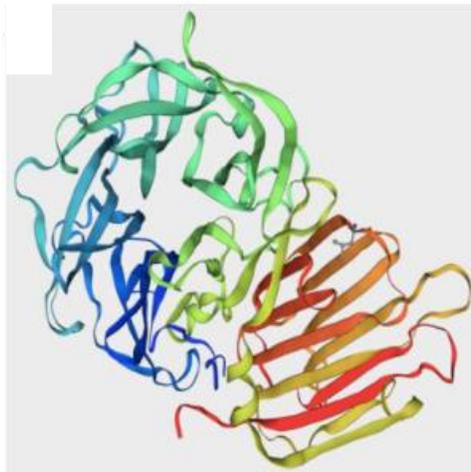
**Figura 11.** Morfología de un cultivo de *Bacillus velezensis* YB-130 endófito. Tinción de Gram del cultivo YB-130 (a) y microscopía electrónica de barrido (b). Figuras obtenidas de Xu *et al.*, 2020.

### 3. Justificación

En nuestro grupo de investigación se aisló una cepa de *B. Velezensis*, capaz de utilizar a la agavina como única fuente de carbono, a partir de los residuos de agave provenientes de la industria tequilera. Esta cepa se caracterizó, así como su extracto enzimático, observándose actividad inulinasa. Sin embargo, la cantidad de enzima producida por este microorganismo fue muy baja para poder estudiarla. Por tal motivo, se decidió analizar el genoma de *B. Velezensis* mediante un análisis bioinformático, para poder clonar y expresar a la enzima, encontrando no solo el gen de la inulinasa sino también el de una levansasa y una levansacarasa. Se realizó un alineamiento de sus secuencias con 15 cepas diferentes, evaluando la variabilidad de nucleótidos entre ellas. También, se alinearon las secuencias de aminoácidos para verificar que las enzimas de las cepas analizadas contaran con los motivos conservados. Ambos alineamientos se llevaron a cabo con ayuda del software Clustal Omega (EBI).

Previo a lo desarrollado en este trabajo, se obtuvieron las enzimas recombinantes de la inulinasa, la levansacarasa y la levansasa de *B. velezensis* gracias al trabajo de investigación desarrollado por el M en C.B. Alam Uriel Abad González (Abad, 2022), parte del grupo de investigación del laboratorio 314.

Así mismo en el trabajo del M en C.B Abad se evaluó la concordancia de la posible estructura terciaria de cada enzima con la propia de las enzimas pertenecientes a la familia GH-J, utilizando Swiss-Model de ExPASy y usando como referencia la inulinasa de *Thermotoga marítima* (Figura 12).



**Figura 12.** Estructura terciaria obtenida mediante el software Swiss-Model de ExPASy. Referencia: inulinasa de *Thermotoga marítima*.

Previo a este trabajo no se establecieron las mejores condiciones de inducción y de la actividad enzimática. Por tal razón, el objetivo de este trabajo será determinar las condiciones de expresión y actividad enzimática para la inulinasa recombinante de *B. velezensis*.

## 4. Hipótesis

La cantidad de inulinasa de *B. velezensis* producida en un sistema recombinante se verá incrementada comparada con la enzima silvestre.

## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivo general

Determinar las mejores condiciones de expresión y de reacción de la inulinasa recombinante de *B. velezensis*, así como comparar su desempeño con aquel de otras inulinasas de fuentes bacterianas.

### 5.2 Objetivos particulares

1. Establecer las mejores condiciones de expresión de la inulinasa recombinante.
2. Determinar el mejor procedimiento para la purificación de la enzima y comprobar su pureza.
3. Determinar las mejores condiciones de reacción de hidrólisis de la inulina de agave (pH temperatura y sustrato) catalizada por la inulinasa recombinante.

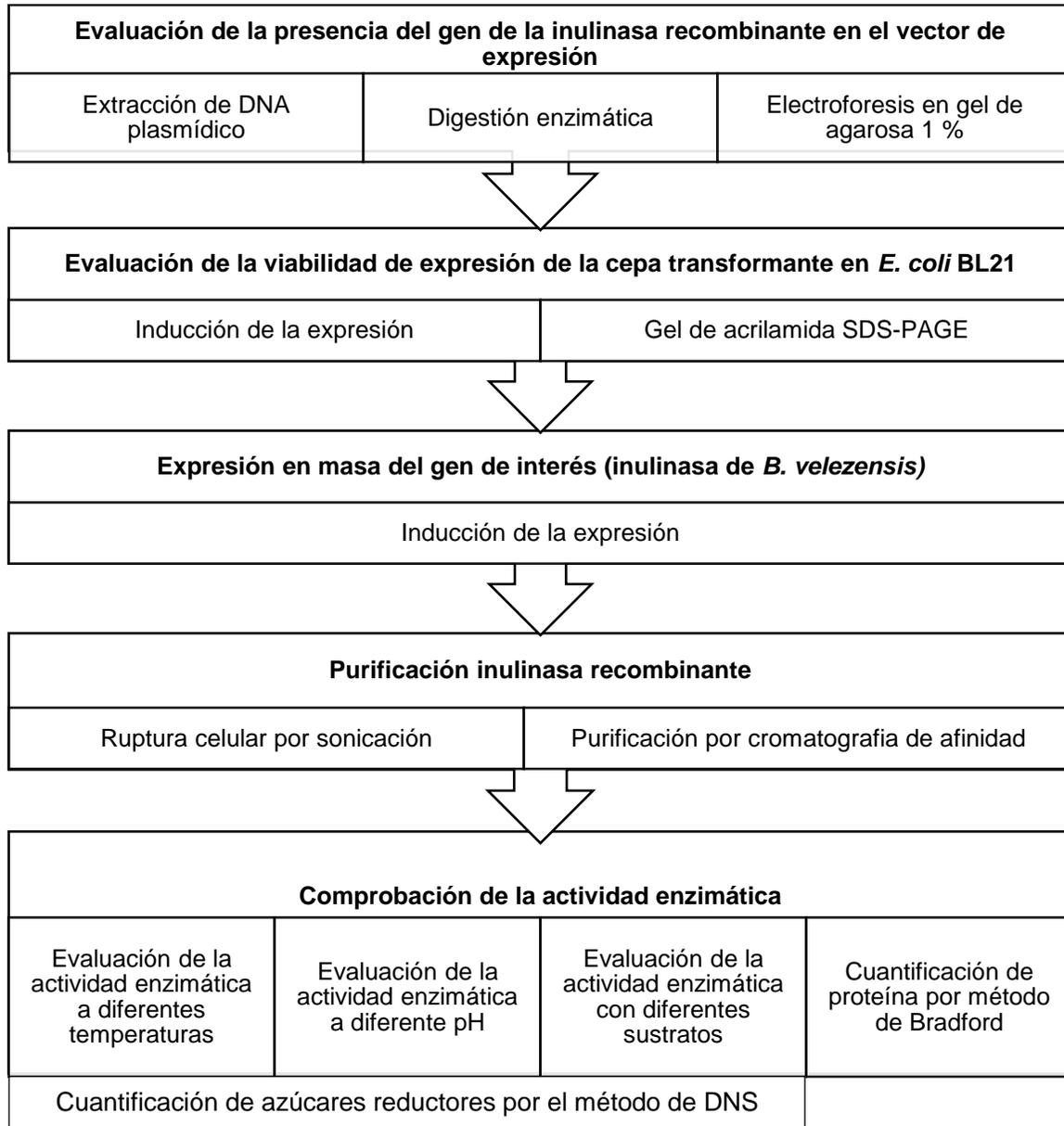
## 6. Materiales y Métodos

### 6.1 Materiales

Equipo	Marca
Refrigerador	Whirlpool
Ultracongelador ULT-390-3-A-30	Gs Laboratory
Baño de agua	IKA
Cámara de electroforesis para DNA	BIO-RAD
Cámara de electroforesis para proteínas	BIO-RAD
Centrífuga	Eppendorf
Centrífuga Pro-Research	Centurion Scientific Lid
Columna HisTrap™ HP 5 mL	Cytiva
Espectrofotómetro UV-Vis Genesys 10S	Thermo Scientific
Fuente de poder	Major Science
Incubadora	WiseCube
Incubadora Heratherm™	Thermo Scientific
Incubadora Innova 4330	New Brunswick Scientific
Potenciómetro	Beckman
Purificador de Agua MilliQ	Millipore
Ultrasonic Processor	Cole-Parmer
Ultrasonic Cleaner	Branson
Thermomixer	Eppendorf

Micropipeta 200 $\mu$ L	Gilson
Micropipeta 1000 $\mu$ L	Gilson
Fast protein liquid chromatography (FPLC)	General Electric

## 6.2 Metodología



### **6.3 Crecimiento del cultivo *E. coli***

Para evaluar la viabilidad de *E. coli* BL21 DE3 transformada con el gen de la inulinasa de *B. velezensis*, se prepararon medios sólido agar-LB Broth (Miller), 50 mL de LB Broth y 2.25 g de agar, adicionado con kanamicina 50 µg/mL, en cajas Petri donde se sembró la cepa por estriado por agotamiento. Las cajas se incubaron toda la noche a 37°C y, posteriormente, se eligieron algunas colonias transformadas, que se crecieron en medio LB líquido con kanamicina durante 15 h y se conservaron a -70 °C en glicerol al 15 % para su uso durante el resto de la experimentación.

### **6.4 Extracción de DNA**

Con la finalidad de verificar que el plásmido tuviera el gen de la inulinasa se extrajo el pDNA y se purificó usando el kit Plasmid Mini-Prep Kit – Column Kit de Jena Bioscience, siguiendo sus especificaciones. Se tomó una muestra de 3 mL del cultivo en medio líquido y se centrifugó durante 6 minutos a 6000 rpm. El pellet se resuspendió en 300 µL de buffer de lisis. Se añadieron 2 µL de RNasa A al buffer de neutralización previo a la adición de 300 µL de buffer a la muestra, mezclando suavemente invirtiendo el tubo de 4 a 6 veces. La muestra se centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente en una microcentrífuga. Posteriormente se activó la columna de afinidad con 100 µL de buffer de activación y se centrifugó a 10000 rpm por 30 segundos. Después se colocó el sobrenadante resultado del paso de neutralización y se centrifugó por 30 segundos a 10000 rpm. Se añadieron 500 µL de buffer de lavado con etanol a la columna de afinidad y se centrifugó nuevamente a 10000 rpm por 30 segundos y se desechó el sobrenadante.

Se colocó la columna en un nuevo tubo Eppendorf y se adicionaron 50 µL de buffer de elución en el centro de la membrana de la columna, se incubó por un minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 10000 rpm por un minuto para eluir el DNA (Jena Bioscience, 2021).

### **6.5 Digestión enzimática**

Las enzimas de restricción son endonucleasas que reconocen secuencias específicas palindrómicas de la doble hélice del DNA y lo cortan en ambas cadenas. Han sido identificadas en numerosos organismos procariontes y se considera que forman parte de un sistema de defensa contra DNA exógeno (Pingoud *et al.*, 1993).

La enzima NdeI tiene un sitio de corte ubicado en CA/TATG, mientras que el sitio de corte de la enzima XhoI se encuentra en C/TCGAG.

Con el objetivo de comprobar la presencia del plásmido en *E. coli* como resultado de la transformación y la viabilidad del uso del cultivo bacteriano, se realizó una digestión enzimática.

Para ella se generó un medio de reacción compuesto por 5  $\mu\text{L}$  del plásmido purificado anteriormente, 1  $\mu\text{L}$  de buffer (CutSmart), 3  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 1  $\mu\text{L}$  de cada enzima de restricción (NdeI y XhoI). La reacción se incubó a 37 °C por una hora.

### **6.6 Electroforesis en gel de agarosa al 1 %**

La electroforesis en gel de agarosa es una técnica que permite la separación de moléculas cargadas en función de su forma y tamaño. Durante la gelación, los polímeros de agarosa se asocian no covalentemente y forman una red porosa. Al aplicar una corriente, los fragmentos de DNA migrarán al ánodo, ya que el esqueleto de fosfato está cargado negativamente. Debido a que las moléculas de DNA tienen una relación masa/carga uniforme, se separan de acuerdo con su tamaño de tal manera que la distancia que recorra la molécula es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular (Lee *et al.*, 2012).

Durante la experimentación, se preparó un gel al 1 % agarosa-buffer disolviendo 300 mg de agarosa en 30 mL de buffer TB 1X a pH 8, calentándolo suavemente con ayuda de un microondas por 40 segundos. La mezcla se vertió en el soporte del gel de la cámara de electroforesis y se distribuyó 1  $\mu\text{L}$  de bromuro de etidio utilizando una micropipeta.

Se realizó la electroforesis a 75 V por una hora y media, colocando las muestras de antes y después de la digestión enzimática en los pozos del gel. El resultado de la experimentación fue revelado mediante la exposición del gel a luz UV en un transiluminador.

### **6.7 Inducción de la expresión**

Una vez comprobada la presencia del plásmido en el microorganismo, se llevó a cabo una inducción de la expresión para verificar la viabilidad de uso del cultivo.

Se realizó un pre-inóculo overnight a 26 °C y 200 rpm en 10 mL de medio LB al cual se le añadieron 5  $\mu\text{L}$  kanamicina (50 mg/mL). Terminado el tiempo de incubación, se añadieron 500  $\mu\text{L}$  del pre-inóculo a 10 tubos con 10 mL de medio de cultivo LB complementados con kanamicina

(50 µg/mL). Los cultivos se incubaron a 37 °C y 200 rpm hasta que alcanzaron una O.D.<sub>600</sub> de 0.6. Previo a la adición de IPTG, se tomó una muestra de 200 µL y se almacenó a 4 °C para su uso posterior. Subsecuentemente, se adicionó el IPTG. Se realizó la inducción a 5 diferentes concentraciones, 0.05, 0.075, 0.1, 0.2 y 0.4 mM, incubándose por 24 h. A partir de los resultados de esta experimentación se decidió trabajar con la concentración a la que se presentara la la expresión de la enzima de forma más notoria (Con esta concentración, se efectuaron ensayos de inducción a dos tiempos distintos, 4 y 24 h. Derivado de esta experimentación, se desarrollaron más ensayos con la finalidad de encontrar las condiciones adecuadas en las que se diera una mayor expresión, esta vez, variando la temperatura a la que se incubó el cultivo (20, 25, 30 y 37 °C).

Se tomó una muestra de 1 mL de cultivo por cada ensayo y se centrifugaron a 12 000 rpm por dos minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet resuspendido en 500 µL de buffer de carga. Las muestras se calentaron por 10 minutos en un baño de glicerol a 87 °C.

### 6.8 Gel de acrilamida SDS-PAGE

En esta técnica, el uso de SDS (Dodecil Sulfato de Sodio por sus siglas en inglés) y un gel de poliacrilamida reducen la influencia de la estructura y carga de las proteínas, por lo que son separadas exclusivamente de acuerdo con el largo de su cadena polipeptídica.

En presencia de SDS y un agente reductor (2-mercaptoetanol), los enlaces di sulfato se rompen impidiendo que la proteína mantenga su estructura secundaria y permitiendo que las moléculas de SDS se unan a la cadena linear en una relación molar constante. Por otro lado, la acrilamida polimerizada forma una matriz adecuada para la separación de proteínas de tamaño regular.

Para cada ensayo de inducción se realizó un gel de acrilamida para comprobar la expresión de la enzima recombinante.

Se hizo un gel de acrilamida al 10 % de 1.5 mm de grosor, con ayuda de placas de la marca BioRad, utilizando las cantidades de reactivo señaladas en la siguiente tabla:

**Tabla 7.** Materiales utilizados en la elaboración de un gel de acrilamida al 10 % SDS-PAGE.

	Gel de separación	Gel de apilamiento
Acrilamida	3.3 mL	0.67 mL
Buffer 3	2.5 mL	-
Buffer 4	-	1.25 mL
SDS 10 %	100 mL	50 mL
Agua destilada	4 mL	3 mL

Persulfato de amonio 10 %	100 mL	100 mL
TEMED	13 mL	13 mL

Se montó el gel en la base y se añadió buffer de corrida 1X en la cámara de electroforesis. Se cargaron 40  $\mu$ L de las muestras previamente preparadas como lo señalado previamente en la sección 6.7, en los pozos del gel y se realizó la electroforesis a 75 V por aproximadamente 45 minutos.

### 6.9 Ruptura celular

Debido a que la enzima recombinante no se excreta al medio, por tal razón fue necesario romper las células para esto el pellet se re-suspendió en buffer de fosfatos pH 8, llevando la muestra a un volumen de 15 mL. Posteriormente, se añadieron 15  $\mu$ L de inhibidor de proteasas para ser sometido a un proceso de sonicación en un baño de hielo, el cual consistió en 30 pulsos de 10 segundos a 30 % de amplitud con 10 segundos de descanso, agitando levemente entre cada pulso para evitar el sobrecalentamiento de la muestra.

### 6.10 Purificación inulinasa recombinante por cromatografía de afinidad en columna de Níquel

Para facilitar la purificación de la proteína recombinante, esta se expresó con una etiqueta de 6 histidinas en el extremo amino terminal (Anexo 6), se decidió utilizar una columna de níquel HisTrap™ HP de 5 mL de la marca Cytiva.

Se inició pasando 10 volúmenes de agua MiliQ por la columna, cantidad equivalente a 50 mL. Posteriormente, se pasaron 4 volúmenes de buffer de fosfatos con imidazol 40 mM. Después, se cargó en la columna todo el volumen de la muestra (15 mL), previamente centrifugada y filtrada con ayuda de un filtro *Simple Pure NY 0.45  $\mu$ m* para jeringa. Posteriormente, se cargaron 5 volúmenes de buffer de imidazol 40 mM para lavar la columna. El siguiente paso fue cargar 10 mL de buffer de fosfatos con imidazol 0.5 M para eluir a la proteína de la columna, esperando encontrar en alguna de ellas la proteína pura. Posteriormente, se pasaron 5 volúmenes de buffer de fosfatos con imidazol 1 M para una última limpieza de la columna. En cada paso se tomó una muestra de 1 mL de la elución para medir su actividad y su pureza. Se cargaron 5 volúmenes de agua MiliQ para retirar cualquier rastro del buffer utilizado en la purificación. Finalmente, se

pasaron 20 mL de etanol al 20 %, previamente filtrado y degasificado, para el almacenamiento de la columna.

### **6.11 Purificación inulinasa recombinante por cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC) – Cromatografía de afinidad**

Para optimizar la purificación de la inulinasa recombinante, se repitió el proceso de cromatografía de afinidad, ahora pasando la muestra por un equipo de cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC por sus siglas en inglés).

Para ello, se repitió la experimentación hasta lo descrito en el punto 7.7, posteriormente se centrifugó la muestra a 9000 rpm por 10 minutos, para retirar los restos celulares de mayor tamaño, y se filtró con ayuda de un filtro estéril para jeringa con un tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$ . Después, se prepararon dos buffers de fosfatos a distintas concentraciones de imidazol, 25 mM y 1 M.

Utilizando el software Unicorn 5.31, se diseñó un experimento con base en el procedimiento anterior de purificación de la proteína recombinante.

Se conectó al equipo la columna de níquel a utilizar, la misma descrita en la sección 6.8. Debido a que cuando el equipo no está en uso se encuentra en una disolución de etanol al 20 %, al igual que la columna, se inició purgando el equipo del etanol pasando al menos 4 volúmenes de agua Milli Q por las bombas, la columna y el resto de las líneas. Posteriormente, se conectaron las líneas A y B de entrada al equipo al buffer de 25 mM y 1 M, respectivamente. Se hicieron pasar por el equipo y columna tres volúmenes de cada buffer, comenzando por el de mayor concentración.

De forma manual, se hicieron pasar por la columna 10 mL de muestra. Se volvió a conectar la columna al equipo, y se inyectaron 0.5 mL de la muestra con ayuda de una jeringa estéril y se dio inicio al experimento en el software.

Al terminar, las fracciones que mostraron valores significativos en el detector UV se almacenaron en tubos Eppendorf para su posterior análisis.

### **6.12 Diálisis**

Para eliminar el imidazol de la muestra de proteína, se llevó a cabo una diálisis, para esto se cortó un trozo de membrana para diálisis de una cinta *Sigma* de una longitud aproximada de entre 7 y 10 cm. Se lavó la membrana con agua del grifo y, posteriormente, con agua destilada para su limpieza total. Utilizando un clip para tubos de diálisis, se cerró uno de los extremos del tubo. Se colocaron 2 mL de las fracciones obtenidas de la purificación por FPLC dentro del tubo y se selló con ayuda de otro clip, procurando dejar la menor cantidad de aire en el interior.

Este arreglo se colocó dentro de un vaso de precipitados de 500 mL con buffer de fosfatos a una concentración de 50 mM a pH 7. Se dejó a una temperatura de 4 °C por 24 horas. Una vez pasado el tiempo estipulado, la muestra en el interior del tubo fue almacenada a -70°C en un tubo Falcon estéril de 15 mL para su posterior concentración por liofilización.

### **6.13 Liofilización**

Se cambió la tapa de los tubos Falcon en los cuales se encontraban almacenadas las muestras resultantes de la diálisis por una de papel aluminio, a la cual se le hicieron pequeños orificios. Los tubos fueron entonces almacenados a -70 °C en hielo seco hasta que la muestra estuviera congelada en su totalidad. Posteriormente, se dejaron en la liofilizadora (LABCONCO) por 24 horas, y las muestras obtenidas fueron almacenadas a 4 °C.

### **6.14 Cuantificación de azúcares reductores por DNS**

Para comprobar la actividad enzimática de las fracciones obtenidas después de la purificación, los azúcares reductores producto de la hidrólisis se cuantificaron mediante el método del ácido dinitrosalicílico DNS.

Cuando el ácido 3,4-dinitrosalicílico (DNS) reacciona con los carbohidratos en una solución alcalina que contienen aldehídos (--CHO) o cetonas (--CO--), el ácido es reducido a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, el cual tiene una coloración naranja-rojiza. Dentro de un cierto rango de concentración, la intensidad del color es directamente proporcional a la concentración del azúcar reductor, pudiendo ser determinada por espectrofotometría (Hu *et al.*, 2008).

Se añadieron 100 µL de la reacción, 200 µL de buffer de fosfatos 50 mM pH 8 y 600µL de reactivo DNS a un tubo de ensayo de 10 mL. Posteriormente, la mezcla se colocó en un baño de glicerina a 90 °C por 5 minutos para dar paso a la reacción endotérmica. Una vez transcurrido el tiempo

de reacción, los tubos se dejaron en un baño de hielo por 20 minutos para detenerla. Posteriormente, se añadieron 4 mL de agua MiliQ a cada tubo de ensayo y se midió la absorbancia de cada muestra a 540 nm en un espectrofotómetro. Para cuantificar los azúcares reductores se empleó una curva patrón de fructosa (Anexos 1 y 2).

### **6.15 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática**

Las reacciones se llevaron a cabo en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Se añadieron 40  $\mu$ L de la proteína, 100  $\mu$ L de una solución de inulina de achicoria al 1 % y se añadió buffer de fosfatos 50 mM pH 8 hasta alcanzar un volumen de reacción de 1 mL para obtener una concentración final del sustrato de 0.1%, partiendo de la sugerencia de las mejores condiciones de reacción estipuladas en trabajos anteriores con esta enzima recombinante (Anexo 5). Todas las reacciones se llevaron a cabo por duplicado.

Para cada reacción se realizaron dos controles: un tubo como control de sustrato, conteniendo 100  $\mu$ L de sustrato y el resto de buffer, y otro como control de la enzima, con 40  $\mu$ L de la enzima purificada y el resto de buffer. Los tubos se colocaron en un ThermoMixer C para tubos Eppendorf de 1.5 mL. Las condiciones de reacción fueron de 500 rpm por 20 minutos, y se llevaron a cabo variando la temperatura de reacción cada 5 °C, desde los 40 hasta los 80 °C.

Una vez concluido el tiempo de reacción, las muestras se pusieron en un baño de glicerol a 100 °C por 10 minutos para detener la reacción.

### **6.16 Efecto del pH sobre la actividad enzimática**

El procedimiento se llevó a cabo a las mismas condiciones de reacción que las descritas en el apartado 6.15, esta vez variando el pH de las muestras de 3 a 9 y manteniendo una temperatura constante de 50 °C, temperatura a la cual se observó una mayor actividad enzimática en la experimentación anterior.

Para las reacciones a condiciones de pH de 3, 4 y 5 se utilizó buffer de acetatos 50 mM, mientras que para los ensayos a pH 6, 7, 8 y 9 se usó buffer de fosfatos 50 mM.

### **6.17 Efecto del tipo de sustrato sobre la actividad enzimática**

Para comparar la actividad enzimática de la enzima pura con los diferentes sustratos que puede reconocer se realizaron reacciones como se describe en el apartado 6.15 utilizando soluciones al 1 % total de inulina de achicoria, agavina y sacarosa como sustrato, a 50°C y pH 7.

### **6.18 Cuantificación de proteína por método de Bradford**

El método de Bradford se basa en la unión del colorante Azul de Coomasie G-250 a la proteína, el cual forma un complejo con la misma, interactuando con las cargas positivas de la cadena polipeptídica al encontrarse en medio ácido. Este complejo tiene una coloración azul y provoca un cambio en el máximo de absorción de 465 a 595 nm, permitiendo la medición de la absorbancia de las muestras a 595 nm en un espectrofotómetro y generando una gráfica de absorbancia vs concentración de proteína. Ésta se compara interpolándola con una curva patrón realizada utilizando una proteína estándar (Albúmina de Suero Bovino (BSA)) a diferentes concentraciones conocidas (Bradford, 1975).

La experimentación se inició preparando 25 mL de una solución 1:4 de reactivo de Bradford y agua destilada. En conjunto, se prepararon disoluciones del estándar de proteína (BSA) con concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8, a partir de una solución con concentración de 1 g/L. Asimismo, se prepararon diluciones de 1:10 y 1:100 en 100  $\mu$ L de la muestra problema.

Posteriormente, se construyó una curva de calibración (Anexo 1) con las concentraciones conocidas de albumina sérica bovina (BSA). Las disoluciones de BSA se colocaron en tubos de vidrio y se añadieron 2.5 mL de una solución previamente preparada compuesta por 1 parte de reactivo de Bradford y 4 de agua a cada tubo. Se dejaron incubar las reacciones por 5 minutos. Posteriormente, se leyó la absorbancia cada una de las muestras en el espectrofotómetro UV-Vis Genesys™ 10S de Thermo Scientific™, a una longitud de onda de 595 nm, tomando como blanco la solución del reactivo de Bradford y sin proteína.

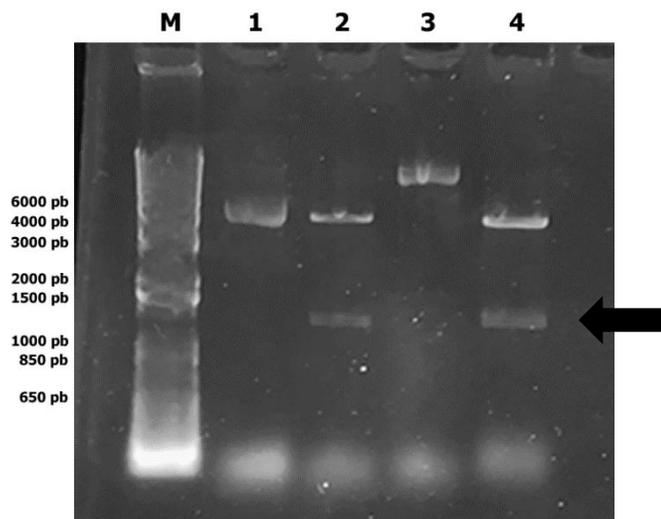
Al conocer los valores de concentración proteica y absorbancia de cada muestra, es posible construir un gráfico, donde el eje de las abscisas corresponde a la concentración de proteína en la muestra (mg/mL), mientras que el de las ordenadas pertenece a los datos obtenidos de absorbancia. Aplicando una regresión lineal a los datos puntuales se obtiene una ecuación lineal, que puede compararse con la ecuación de la Ley de Lambert-Beer.

Las diluciones de las muestras problema fueron sometidas al mismo procedimiento. Se les adicionaron 2.5 mL de la solución de reactivo de Bradford con agua y se dejaron transcurrir 5 minutos antes de realizar las lecturas a la misma longitud de onda (595 nm) en el espectrofotómetro. Con el dato de absorbancia y la ecuación obtenida a partir de la curva de calibración, se realizó el cálculo de la concentración masa/volumen de las diluciones. Para esta deducción, se excluyeron aquellos resultados en los cuales el valor de absorbancia no entrara dentro del rango en el cual es sensible la curva de calibración (0.2 - 0.8).

## 7. Resultados

### 7.1 Purificación del DNA plasmídico

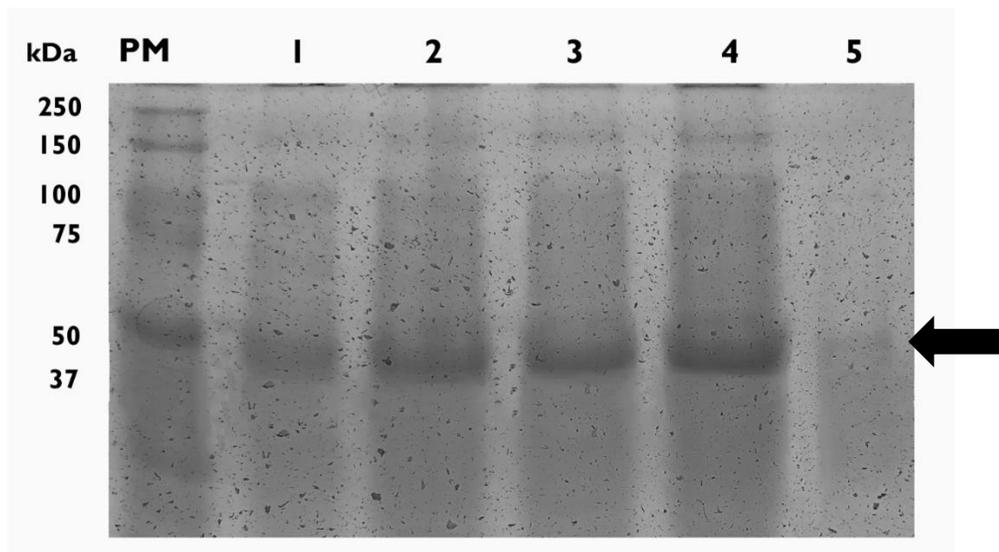
Se llevó a cabo la extracción del DNA como se indica en el apartado 6.4 y se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% (Figura 13). Se puede observar en los carriles 2 y 4 la presencia de dos fragmentos de DNA coincidentes con el tamaño esperado de los cortes realizados por las enzimas NdeI y XhoI: uno de 1470 pb, correspondiente al gen de la inulinasa y otro de 5386 pb, correspondiente al vector pET28b (+), sugiriendo que el inserto se encuentra en el plásmido recombinante y es viable realizar la expresión de la inulinasa recombinante. En los carriles 1 y 2 se muestra el plásmido sin digerir.



**Figura 13.** Electroforesis en gel de agarosa al 1 % del DNA plasmídico puro, donde M corresponde al marcador de DNA, los números 1 y 2 a la construcción pET28b(+):InU sin digerir y digestión de la construcción pET28b(+):InU, respectivamente. La experimentación se realizó por duplicado, presentando los resultados en los carriles 3 y 4.

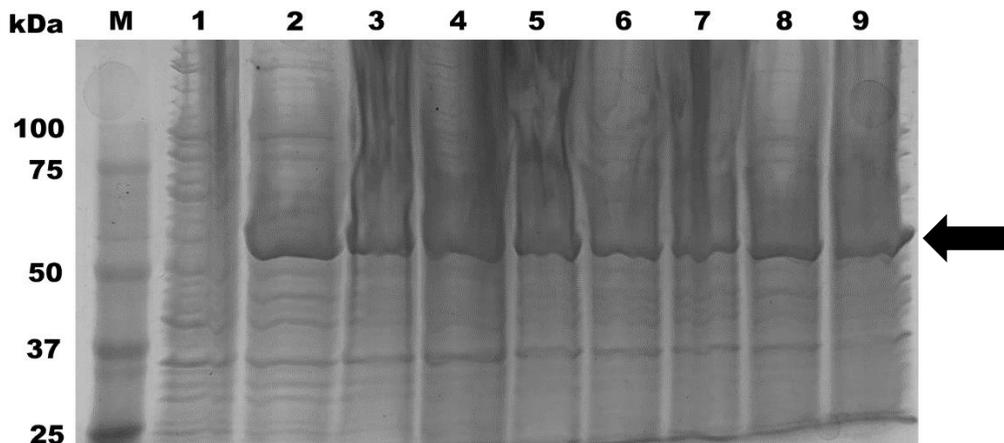
## 7.2 Inducción de la inulinasa recombinante

Una vez corroborado que *E. coli* BL21 (DE3) contenía el plásmido con gen de la inulinasa, se llevó a cabo la inducción de la proteína utilizando IPTG a diferentes concentraciones por 24 h, a 37 °C, observándose que la mejor concentración de inductor fue de 0.2 mM. El tamaño esperado del gen es de 1470 nucleótidos, por lo tanto, se espera una secuencia de 490 aminoácidos. Considerando esto, la proteína tendría un peso molecular esperado alrededor de los 54 kDa (Promega, s.f.) (Figura 14).



**Figura 14.** Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de la inducción del gen de la inulinasa recombinante proveniente de *B. velezensis* con diferentes concentraciones de IPTG. Se muestra la migración del marcador de peso molecular (PM), inducción con 0.05 mM (1), 0.075 mM (2), 0.1 mM (3), 0.2 mM (4) y 0.4 mM (5) de IPTG.

Posteriormente con la concentración del IPTG determinada, se varió el tiempo y la temperatura de inducción (Figura 15). En el gel se puede observar que existe una banda amplia e intensa en los carriles 2 al 9, alrededor de un peso molecular de 55 kDa, en los cuales se cargaron las muestras a diferentes condiciones de temperatura (20,25, 30 y 37 °C) y tiempo (4 y 24 h).



**Figura 15.** Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de la inducción del gen de la inulinasa recombinante proveniente de *B. velezensis*. Se muestra la migración del marcador de peso molecular (M), muestra control previo a la inducción (1), inducción a 20 °C por 4 horas (2), inducción a 20 °C por 24 h (3), inducción a 25 °C por 4 horas (4), inducción a 25 °C por 24 h (5), inducción a 30 °C por 4 horas (6), inducción a 30 °C por 24 h (7), inducción a 37 °C por 4 horas (8), inducción a 37 °C por 24 h (9).

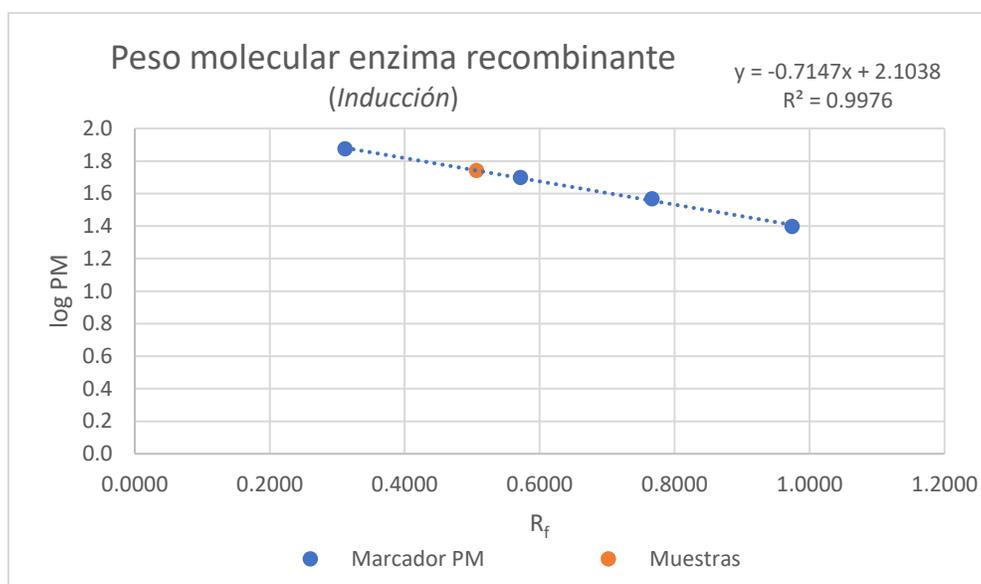
Como se puede observar en la figura 15, en el carril 2 la banda, de aproximadamente 55 kDa, es la más intensa por lo que, se decidió que las mejores condiciones de inducción fueran 20°C por 4 horas, aunque también es claro que en todas las condiciones probadas hubo expresión de la proteína.

Para corroborar el peso molecular de la proteína expresada, se realizó un análisis cuantitativo con ayuda de la distancia de migración del marcador de peso molecular para generar una curva patrón de pesos moleculares y así determinar el peso de las muestras en el gel. Se utilizó la distancia total recorrida y la distancia de cada una de las bandas correspondiente a cada peso molecular establecido en el marcador (carril M), a partir del cociente de la distancia de cada muestra entre la distancia total recorrida por la muestra se obtuvo el  $R_f$ , como se observa en la tabla 8.

**Tabla 8.** Valores correspondientes al cálculo del factor  $R_f$  y al logaritmo del peso molecular del marcador.

Marcador			
PM (kDa)	Distancia (cm)	$R_f$	log PM
75	2.4	0.3117	1.8751
50	4.4	0.5714	1.6990
37	5.9	0.7662	1.5682
25	7.5	0.9740	1.3979
Total	7.7		

Posteriormente, se construyó una curva patrón de pesos moleculares (Figura 16) en donde el eje de las ordenadas corresponde al logaritmo de los pesos moleculares del marcador y el eje de las abscisas al factor  $R_f$  obtenido. Se realizó una regresión lineal, con cuya ecuación se efectuó un cálculo de interpolación utilizando el valor del factor  $R_f$  de las muestras, para obtener así el logaritmo del peso molecular correspondiente a la inulinasa recombinante y, consecuentemente, su peso molecular.



**Figura 16.** Curva patrón de pesos moleculares en función de un factor  $R_f$ . En azul se muestran los datos correspondientes al marcador de peso molecular. La línea intermitente indica la regresión lineal aplicada a estos valores. En la esquina superior derecha se observa la ecuación obtenida a partir de la regresión. En naranja se indica el dato correspondiente a las muestras analizadas, derivadas de la inducción de la expresión de la inulinasa recombinante a diferentes condiciones (se tomó como un solo dato debido a que, en todos los casos y como se puede observar en la figura 13, la banda de mayor anchura se ubica en un mismo valor de peso molecular).

El peso molecular aproximado obtenido del análisis fue de 55.18 kDa (Tabla 9), este resultado se encuentra dentro del intervalo de peso molecular esperado para la inulinasa recombinante de *B. velezensis* (45-58 kDa), tomando como referencia el peso molecular supuesto por la longitud del gen y aquellos reportados para otras inulinasas provenientes de *Bacillus* (Kwon *et al.*, 2003). Esto sugiere que se logró la expresión de la proteína recombinante.

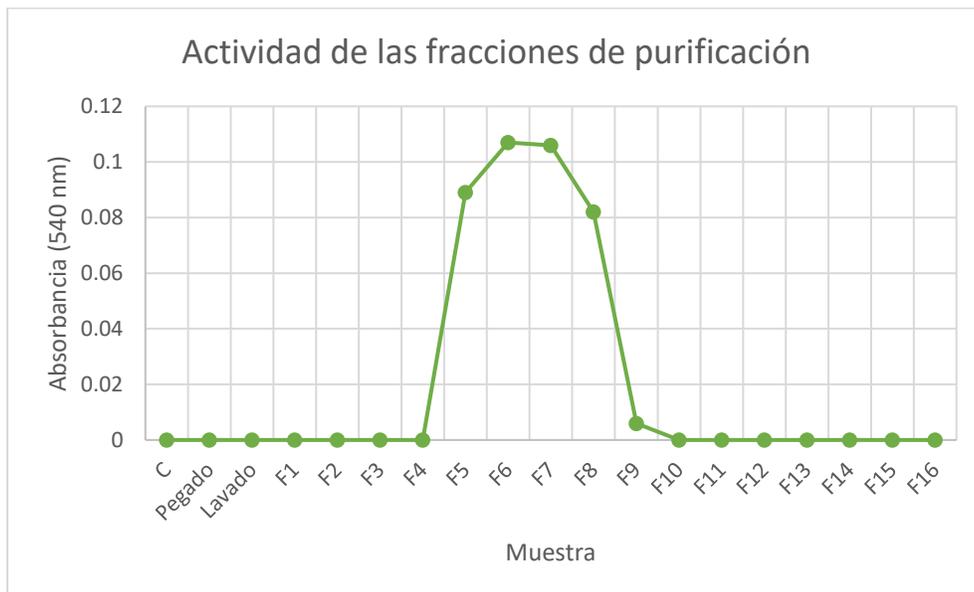
**Tabla 9.** Valores correspondientes al cálculo del factor  $R_f$  de las muestras, al logaritmo del peso molecular de las mismas (obtenido a partir de la interpolación) y al cálculo del peso molecular de la proteína expresada.

Muestras			
Distancia (cm)	$R_f$	log PM	PM
3.9	0.5065	1.7418	<b>55.18</b>

### 7.3 Purificación

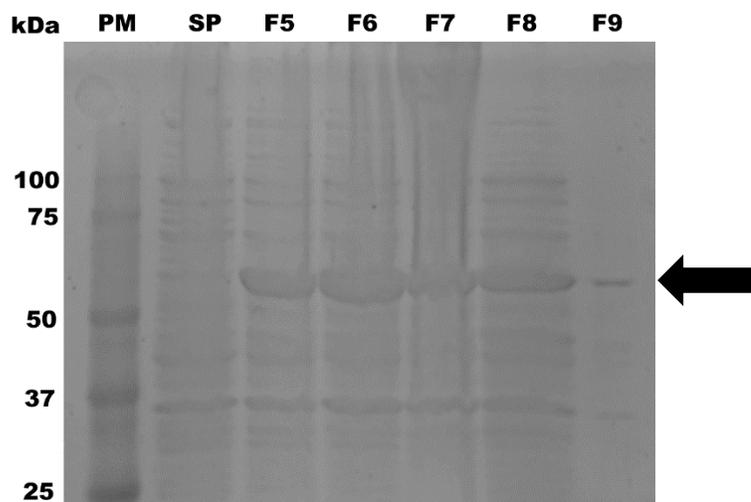
Con el objetivo de detectar la actividad enzimática en cada una de las fracciones eluídas de la columna de afinidad, indicativo de la presencia de la inulinasa, se realizaron reacciones a 50 °C por 20 minutos con 1 % de inulina de achicoria como sustrato. Se determinó la concentración de fructosa al terminar la reacción para cada muestra, de acuerdo con el método de cuantificación de azúcares reductores, descrito en la sección 6.14 y con ayuda de una curva patrón de fructosa elaborada previamente (Anexo 1).

Como se observa en la figura 17, las fracciones que presentan actividad enzimática van de la fracción 5 a la 9, indicando la presencia de la inulinasa recombinante, siendo las fracciones 6 y 7 las de mayor interés para la continuidad de la experimentación, con un valor más elevado.



**Figura 17.** Gráfico de la absorbancia medida a 540 nm durante la realización del método con DNS para la cuantificación de azúcares reductores en función de cada una de las muestras obtenidas en el proceso de purificación.

Posteriormente para la evaluar la pureza de las fracciones se realizó un gel de poliacrilamida SDS-PAGE, tal como está descrito en la sección 6.8. Se cargó una muestra control sin inducción (Carril SP) y muestras de las fracciones 5 a la 9. Como se puede observar en la figura 18, la mayor cantidad de la proteína, indicada por el ancho de la banda, parece encontrarse entre las fracciones 6, 7 y 8 (carriles 3, 4 y 5, respectivamente) que corresponden a las muestras de mayor actividad, mientras que la fracción que contiene a la proteína más pura es la 9 (carril 6), aunque la actividad presentada no es mucha, debido a que la concentración de proteína podría ser baja.



**Figura 18.** Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de las fracciones de purificación por afinidad de níquel de la inulinasa recombinante de *B. velezensis*. Se muestra en el primer carril (PM) la migración del marcador de peso molecular. En el segundo carril se observa la migración de la muestra control sin ser sujeta a un proceso de purificación (SP). En los carriles siguientes se presenta la migración de las fracciones 5-9, en orden ascendente (F5-F9).

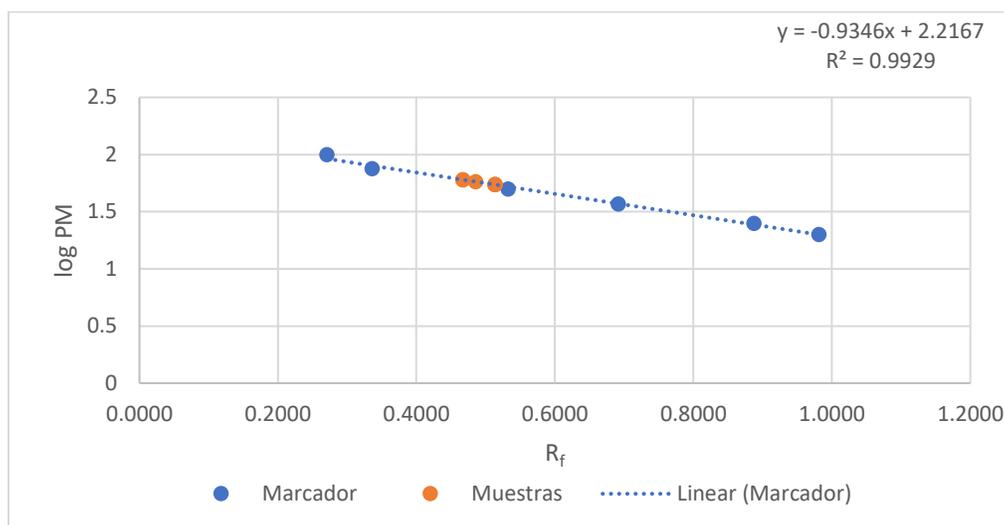
Para determinar el peso molecular de la proteína, se repitió el procedimiento realizado en el apartado 7.2 para el análisis del SDS-PAGE de la inducción de la expresión. Se efectuó una regresión lineal a partir de los datos mostrados en la tabla 10 de la migración del marcador de peso molecular (Figura 19). Posteriormente, se calculó el peso molecular de la proteína presente en mayor cantidad para cada fracción. Los resultados de los análisis mostrados en la tabla 11 sugieren que la proteína purificada en la fracción 9, la cual también se encuentra en el resto de las fracciones evaluadas, es la inulinasa recombinante de *B. velezensis*, pues su peso molecular se encuentra muy cercano al intervalo de peso molecular esperado para la misma (45-58 kDa).

**Tabla 10.** Valores correspondientes al cálculo del factor  $R_f$  y al logaritmo del peso molecular del marcador.

Marcador		
PM (kDa)	$R_f$	log PM
100	0.2710	2
75	0.3364	1.8751
50	0.5327	1.6990
37	0.6916	1.5682
25	0.8879	1.3979
20	0.9813	1.3010

**Tabla 11.** Datos obtenidos a partir de la migración de las muestras en el gel de agarosa. Datos del valor de la proporción  $R_f$  y del cálculo del logaritmo de peso molecular, así como del peso molecular de las muestras.

Muestras				
Carril	Distancia (cm)	$R_f$	log PM	PM
Control	5.2	0.4860	1.7625	<b>57.88</b>
F5	5.5	0.5140	1.7363	<b>54.49</b>
F6	5.5	0.5140	1.7363	<b>54.49</b>
F7	5.5	0.5140	1.7363	<b>54.49</b>
F8	5	0.4673	1.7800	<b>60.25</b>
F9	5	0.4673	1.7800	<b>60.25</b>



**Figura 19.** Gráfico del logaritmo de peso molecular en función de un factor  $R_f$ . En azul se muestran los datos correspondientes al marcador de peso molecular. La línea intermitente indica la regresión lineal aplicada a estos valores. En la esquina superior derecha se observa la ecuación obtenida a partir de la regresión. En naranja se indican los datos correspondientes a las muestras analizadas, derivadas de la purificación de la inulinasa recombinante por afinidad.

Posteriormente, se cuantificó la cantidad de proteína presente en la fracción 8, que presentaba mayor actividad, por el método de Bradford, descrito en la sección 6.18, obteniéndose una concentración de **0.7266** mg de proteína por cada mililitro, como se puede observar en la tabla 12.

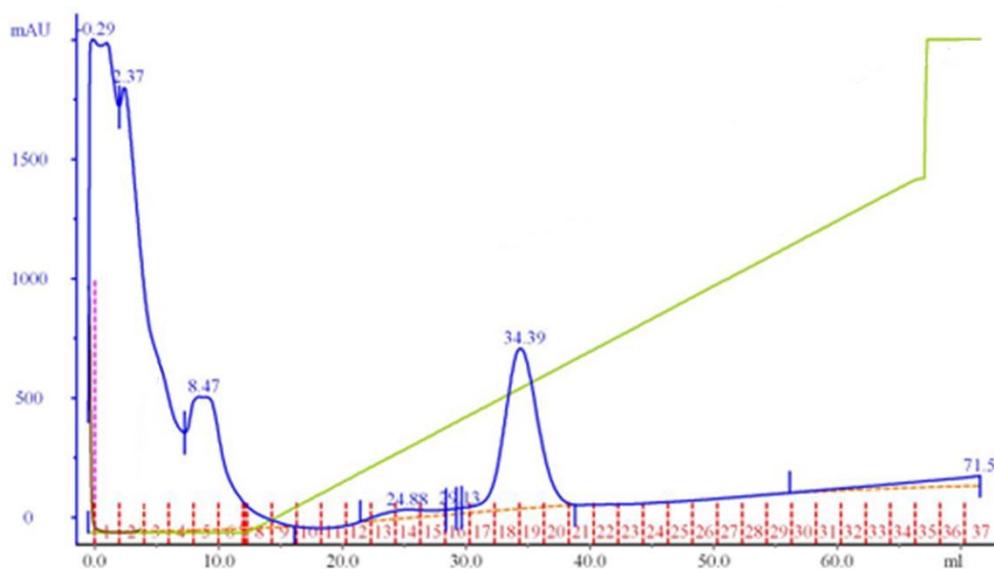
**Tabla 12.** Valores de concentración m/v y molar de las diluciones de la muestra problema, obtenidas por medio del método de Bradford para cuantificación de proteínas.

Muestras	Absorbancia	Concentración [mg/mL]	Concentración [mM]
1	0.643	0.7266	<b>0.01094</b>
1:10	0.105	0.1186	<b>0.00179</b>
1:100	0.013	-	-

### 7.3.1 Cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad

Para poder controlar las condiciones de purificación, esta se llevó a cabo en un FPLC, puesto que permite controlar el flujo de buffer, la inyección de proteína y la recolección de muestras. El resultado de la purificación se muestra en la Figura 20 en donde se observan tres picos principales con valores significativos, correspondientes a las fracciones 2, 5 y 18 y 19. Las condiciones de trabajo se describen en el apartado 6.11.

Estas fracciones se recolectaron en tubos Eppendorf y se llevaron a cabo reacciones de cuantificación de azúcares reductores (DNS) para corroborar la actividad enzimática de las muestras.

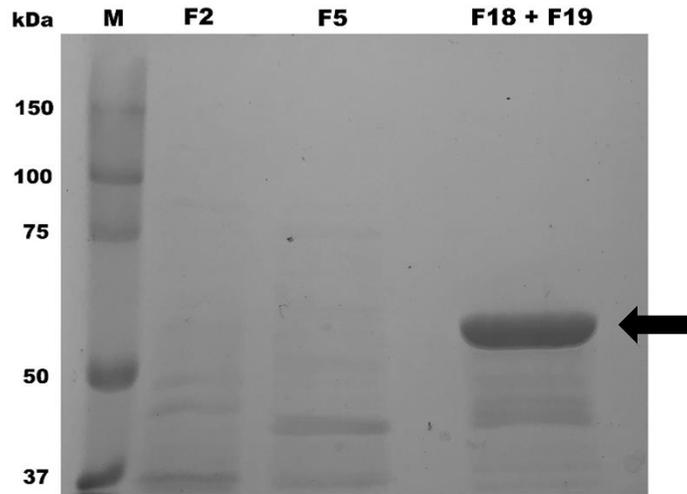


**Figura 20.** Cromatograma resultante del ensayo de cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC) utilizando una columna de afinidad de níquel His-Trap™ HP 5 mL. En él se muestra en azul la curva de absorbancia en unidades de mili absorbancia (mAU) en función de los mililitros pasados por la columna. Se presentan sobre las crestas de los picos obtenidos los datos numéricos correspondientes al eje de las abscisas. En color amarillo se muestra el gradiente de concentración de buffer de elución (buffer de fosfatos 0.5 M pH 7). Sobre el eje de las abscisas se indican con color rojo las fracciones resultantes durante el proceso, cada una numerada de forma ascendente del 1 al 37, y siendo delimitadas por una línea intermitente.

Los resultados mostraron que las fracciones 18 y 19 fueron las únicas que contaron con una actividad enzimática apreciable (Anexo 4).

Debido a que los valores de absorbancia de ambas fracciones al realizar la experimentación eran muy similares, se decidió juntarlas en una sola muestra, para obtener así una mayor cantidad de la proteína recombinante a analizar.

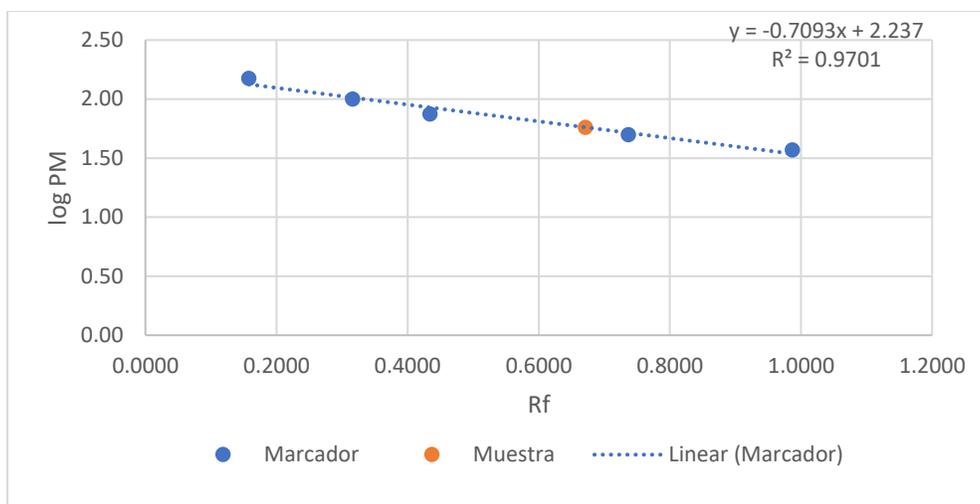
Posteriormente, se llevó a cabo una electroforesis en gel de acrilamida SDS-PAGE para corroborar la pureza y peso molecular de la inulinasa recombinante, en caso de ser positivamente identificada.



**Figura 21.** Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de la purificación de una inulinasa recombinante proveniente de *B. velezensis* por cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC), utilizando una columna de afinidad de níquel His-Trap™ HP 5 mL. Se muestran la migración del marcador de peso molecular (M) y de las fracciones con presencia de proteína obtenidas durante el proceso (F2, F5 y F18 + F19).

Como se muestra en la figura 21, existe una alta concentración de una proteína de peso molecular mayor a 50 kDa, observada en el carril de la muestra compuesta por las fracciones 18 y 19.

Siguiendo el procedimiento descrito en la sección 7.2, se obtuvo el peso molecular aproximado de la inulinasa recombinante (Figura 22, tablas 13 y 14), resultando en un valor de 57 kDa.



**Figura 22.** Gráfico del logaritmo de peso molecular en función de un factor  $R_f$ . En azul se muestran los datos correspondientes al marcador de peso molecular. La línea intermitente indica la regresión lineal aplicada a estos valores. En la esquina superior derecha se observa la ecuación obtenida a partir de la regresión. En naranja se indica el dato correspondiente a la muestras analizadas, derivadas de la purificación de la inulinasa recombinante por afinidad en FPLC.

**Tabla 13.** Datos obtenidos a partir de la migración de las muestras en el gel de agarosa. Datos del valor de la proporción  $R_f$  y del cálculo del logaritmo de peso molecular, así como del peso molecular de las muestras.

Marcador			
PM (kDa)	Distancia (cm)	$R_f$	log PM
150	1.2	0.1579	2.18
100	2.4	0.3158	2.00
75	3.3	0.4342	1.88
50	5.6	0.7368	1.70
37	7.5	0.9868	1.57
	7.6		

**Tabla 14.** Datos obtenidos a partir de la migración de la muestra en el gel de agarosa. Datos del valor de la proporción  $R_f$  y del cálculo del logaritmo de peso molecular, así como del peso molecular de la muestra.

Muestra		
Distancia (cm)	$R_f$	log PM
5.1	0.6711	1.7610
	PM	<b>57.68</b>

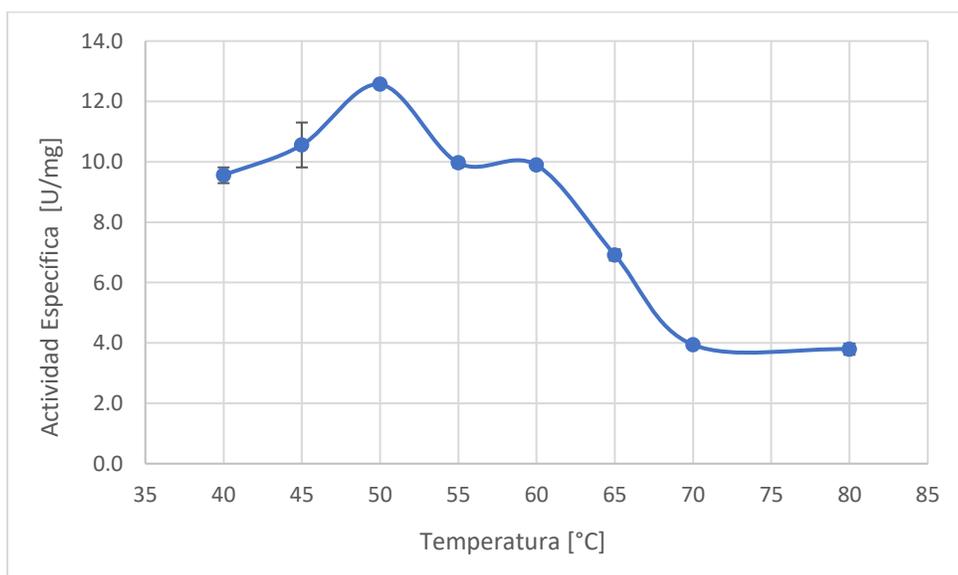
#### 7.4 Evaluación de la actividad enzimática a diferentes condiciones de temperatura

Se evaluó el comportamiento enzimático de la proteína purificada a distintas condiciones de temperatura, manteniendo constante el pH (8) (condición evaluada previamente utilizando el sobrenadante celular) y sustrato utilizado (inulina de achicoria).

Siguiendo el procedimiento descrito en la sección 6.15, se montaron las reacciones por duplicado. Posteriormente, se repitió la técnica descrita en la sección 6.14 para la obtención de la concentración de fructosa final. Conociendo el tiempo de reacción (20 minutos) y el volumen de reacción en el cual se llevó a cabo la experimentación (1 mL), se realizó el cálculo de la actividad (U) para cada muestra. La actividad se definió como cantidad de enzima necesaria para producir un  $\mu\text{mol}$  de fructosa por minuto.

Posterior a la obtención de la cantidad de proteína con el método de Bradford, el cual se encuentra especificado en la sección 6.18, y conociendo la cantidad de enzima añadida a la reacción, se pudo efectuar el cálculo de la actividad específica en U/mg. Para la obtención de un único valor correspondiente a cada temperatura, se calculó el promedio de los datos por duplicado.

Como se muestra en la figura 23, la temperatura a la cual se observó el mayor valor de actividad fue a 50 °C, tomándose como la temperatura ideal de reacción para el resto de la experimentación.



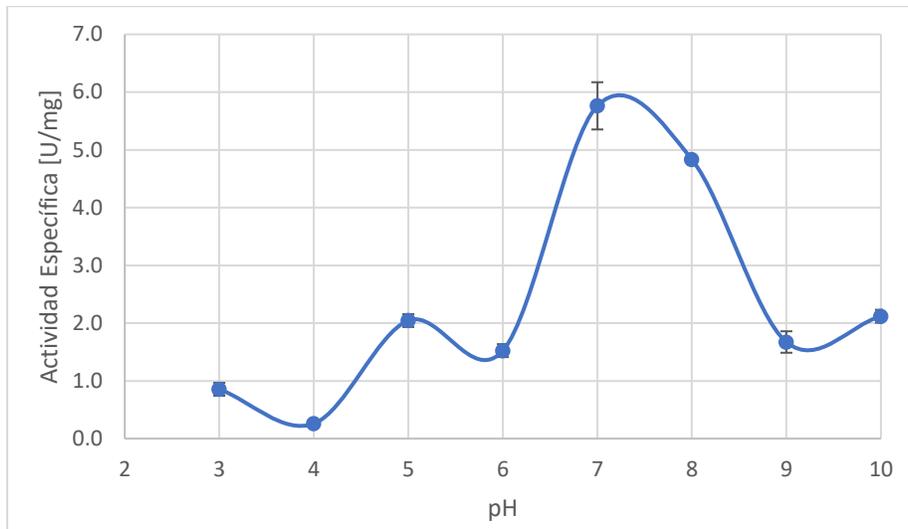
**Figura 23.** Efecto de la temperatura en la actividad específica de la enzima. Las reacciones se realizaron al 1 % de sustrato (inulina de achicoria), a pH 7 y evaluadas a diferentes valores de temperatura (40-80 °C).

### 7.5 Evaluación de la actividad enzimática a diferentes condiciones de pH

Una vez obtenida la mejor temperatura, se evaluó el comportamiento enzimático de la proteína pura a distintas condiciones de pH, manteniendo constante la temperatura (50 °C) y sustrato utilizado (inulina de achicoria).

Para montar las reacciones, se siguió la técnica estipulada en la sección 6.16 por duplicado. Posteriormente, se repitió el procedimiento descrito en la sección 7.4 para el cálculo de la actividad específica de las muestras.

Como se observa en la figura 24, el valor de pH en el cual se presentó una mayor actividad enzimática fue a un valor de 7, difiriendo del valor propuesto previamente por el equipo de investigación (pH 8).



**Figura 24.** Efecto del pH sobre la actividad de la inulinasa. Las reacciones se realizaron al 1 % de sustrato (inulina de achicoria), a 50 °C y evaluadas a diferentes valores de pH (3-10).

### 7.6 Evaluación de la actividad enzimática con diferentes sustratos

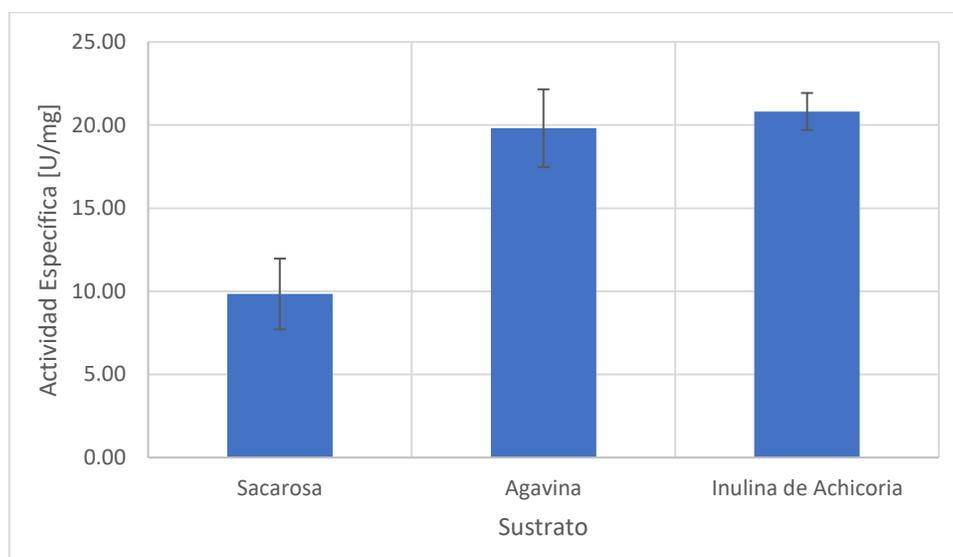
Debido a que las inulinasas son capaces de hidrolizar diferentes sustratos y con la finalidad de determinar si efectivamente la enzima es una inulinasa, se evaluó el comportamiento enzimático de la proteína purificada con diferentes sustratos, manteniendo constante la temperatura (50 °C) y pH (7).

Se montaron las reacciones por duplicado de acuerdo con el método planteado en la sección 6.17, empleando concentraciones de sustrato similares para cada ensayo (Tabla 15). Posteriormente, se repitió la técnica descrita en la sección 7.4 para la obtención de los valores de actividad específica para cada reacción.

Se generó el gráfico de barras mostrado en la figura 25, en el cual se observa una diferencia considerable entre el valor obtenido para la sacarosa y los valores obtenidos para la agavina y la inulina de achicoria.

**Tabla 15.** Valores de concentración molar de sustrato en las reacciones al 1 % total de sustrato en peso.

Concentración molar	
Sustrato	[ $\mu\text{mol/mL}$ ]
Agavina	2.63
Sacarosa	2.92
Inulina Achicoria	2.70



**Figura 25.** Efecto del sustrato en la actividad específica de la enzima. Las reacciones se realizaron a 50 °C, a pH 7 y evaluadas utilizando diferentes sustratos (sacarosa, agavina e inulina de achocoria).

## 8. Conclusiones

Se evaluó la funcionalidad del gen de la inulinasa de *B. velezensis* dentro del vector de expresión pET28b(+) en *E. coli* BL21 (DE3).

Se definieron las mejores condiciones de tiempo, temperatura y concentración de inductor (IPTG) de la inulinasa recombinante, concluyendo que la mayor expresión se da a una temperatura de 20 °C por 4 horas y añadiendo una concentración de 0.2 mM de IPTG durante la inducción.

De igual forma, se determinaron las mejores condiciones de pH, sustrato y temperatura en las cuales la proteína presentaba una mayor actividad enzimática. La reacción debe llevarse a cabo en un medio a pH 7, a 50 °C por 20 minutos, observándose que la enzima presentaba una mayor actividad con inulina de agave y de achicoria en comparación con la sacarosa.

Por otro lado, al utilizar el método de cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC), se logró una mejoría en el proceso de purificación de la inulinasa recombinante de *B. velezensis*,

convirtiéndose así en una base para la planeación de la purificación de las otras dos enzimas provenientes del mismo microorganismo y obtenidas previamente de manera recombinante (levanasa y levansacarasa).

## 9. Perspectivas

- ❖ Evaluación de los parámetros cinéticos ( $V_{max}$ ,  $k_{cat}$ ,  $K_m$ ,  $k_{cat}/K_m$ ) de la proteína.
- ❖ Expresión y purificación y posterior estudio de la levanasa y levansacarasa recombinantes de *B. velezensis*.
- ❖ Determinar si existe sinergia entre la inulinasa, levanasa y levansacarasa purificadas en el proceso de la degradación de la inulina de agave.

## 10. Referencias

- Abad González, A. A. (2021). *Producción y caracterización de una fructosilhidrolasa de Bacillus amyloliquefaciens 12GeP recombinante*. CDMX: Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Altenbach, D., Nuesch, E., Meyer, A. D., Boller, T., & Wiemken, A. (2004). The large subunit determines catalytic specificity of barley sucrose:fructan 6-fructosyltransferase and fescue sucrose:sucrose 1 fructosyltransferase. *FEBS Letters*, 214-218.
- Andersone, I., Auzina, L., Vigants, A., Mutere, O., & Zikmanis, P. (2004). Formation of Levan from raffinose by levansucrase of *Zymomonas mobilis*. *Eng. Life Sci.*, 56-59.
- Arrizón, J., Urias-Silvas, J. E., Sandoval, G., Mancilla-Margalli, N. A., Gschaedler, A. C., Morel, S., & Monsan, P. (2014). Production and Bioactivity of Fructan-Type Oligosaccharides. *Food Oligosaccharides*, 184-199.
- Bautista-Justo, M., García-Oropeza, L., Barboza-Corona, J. E., & Parra-Negrete, L. A. (2001). El Agave tequilana Weber y la producción de tequila. *Acta Universitaria*, 26-34.
- Belamri, M., Sassi, A. H., Savart, M., Tantaoui-Elaraki, A., & Cottin, P. (1994). Purification and properties of an extracellular inulinase-like  $\beta$ -fructosidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Letters in Applied Microbiology*, 410-413.
- Blecker, C., Fougnyes, C., Van Herck, J.-C., Chevalier, J.-P., & Paquot, M. (2002). Kinetic Study of the Acid Hydrolysis of Various Oligofructose Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1602-1607.
- Boeckner, L. S., Schnepf, M. I., & Tungland, B. C. (2001). Inulin: A review of nutritional and health implications. *Advances in Food and Nutrition Research*, 1-63.

- Borland, A. M., Hartwell, J., Weston, D. J., Schlauch, K. A., Borland, A. M., Hartwell, J., . . . Cushman, J. C. (2014). Engineering crassulacean acid metabolism to improve water-use efficiency. *Trends in Plant Science*, 327-338.
- Bradford, M. M. (1976). Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 248-254.
- BRENDA. (n. p.). *BRENDA: The Comprehensive Enzyme Information System*. Obtenido de Information on EC 3.2.1.80 - fructan beta-fructosidase and Organism(s) Aspergillus ficuum: <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.80&Suchword=&reference=&UniProtAcc=&organism%5B%5D=Aspergillus+ficuum>
- Chacón, A. (2006). Perspectivas agroindustriales actuales de los oligofruetosacáridos (FOS). *Agronomía Mesoamericana*, 263-283.
- Chi, Z.-M., Chi, Z., Zhang, T., Liu, G., & Yue, L. (2009). Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 211-220.
- Fazle Rabbee, M., Sarafat Ali, M., Choi, J., Hwang, B. S., Jeong, S. C., & Baek, K.-h. (2019). Bacillus velezensis: A Valuable Member of Bioactive Molecules within Plant Microbiomes. *Molecules*.
- Flores, A. C., Morlett, J. A., & Rodríguez, R. (2016). Inulin potential for enzymatic obtaining of prebiotic oligosaccharides. *Crit. Rev. Food Sci.*, 1893-1902.
- Gao, W., Bao, Y., Liu, Y., Zhang, X., Wang, J., & An, L. (2009). Characterization of Thermo-stable Endoinulinase from a New Strain Bacillus Smithii T7. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 498-506.
- García-Herrera, E., Méndez-Gallegos, S., & Talavera-Magaña, D. (2010). El género Agave spp. en México: Principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 109-127.
- García-Mendoza, A. (2002). Distribution of Agave (Agavaceae) in Mexico. *Cactus and Succulent Journal*, 177-188.
- Gill, P. K., Manhas, R. K., & Singh, P. (2006). Hydrolysis of inulin by immobilized thermostable extracellular exoinulinase from Aspergillus fumigatus. *Journal of Food Engineering*, 369-375.
- Gill, P. K., Sharma, A. D., Harchand, R. K., & Singh, P. (2003). Effect of media supplements and culture conditions on inulinase production by an actinomycete strain. *Bioresource Technology*, 359-362.
- Gong, F., Sheng, J., Chi, Z., & Li, J. (2007). Inulinase production by a marine yeast Pichia guilliermondii and inulin hydrolysis by the crude inulinase. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 179-185.
- Granados, S. (1993). Los agaves en México. *Universidad Autónoma de Chapingo*.
- Guzmán, P. M. (1997). Aguardientes de México; Tequila, Mezcal, Charanda, Bacanora, Sotol. *Bebidas Mexicanas*, 37-40.
- Hu, R., Lin, L., Liu, T., Ouyang, P., He, B., & Liu, S. (2008). Reducing Sugar Content in Hemicellulose Hydrolysate by DNS Method: A Revisit. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 156-161.

- Huerta, S. A., Larralde, C. P., & Narváez, J. (2014). Aplicación de subproductos del agave para la producción de inulinasas microbianas. *Revista Bio Ciencias*, 4-16.
- Jena Bioscience. (23 de July de 2021). *Data Sheet*. Obtenido de Plasmid Mini-Prep Kit - Column Kit: <https://www.jenabioscience.com/images/PDF/PP-204.0002.pdf>
- Jing, W., Zhengyu, J., Bo, J., & Augustine, A. (2003). Production and separation of exo- and endoinulinase from *Aspergillus ficuum*. *Process Biochemistry*, 5-11.
- Kelly, G. (2008). Inulin-Type Prebiotics - A Review: Part 1. *Alternative Medicine Review*, 315-329.
- Kochhar, A., Gupta, A. K., & Kaur, N. (1999). Purification and immobilisation of inulinase from *Aspergillus candidus* for producing fructose. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 549-554.
- Kumar, P. G., Kunamneni, A., Prabhakar, T., & Ellaiah, P. (2005). Optimization of Process Parameters for the Production of Inulinase from a Newly Isolated *Aspergillus niger* AUP19. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1359-1361.
- Kwon, Y.-M., Kim, H.-Y., & Choi, Y.-J. (2000). Cloning and characterization of *Pseudomonas mucidolens* exoinulinase. *J. Microbiol, Biotechnol.*, 238-243.
- Lammens, W., Le Roy, K., Schroeven, L., Van Laere, A., Rabjins, A., & Van den Ende, W. (2009). Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications. *Journal of Experimental Botany*, 727-740.
- Laowklom, N., Chantanaphan, R., & Pinphanichakarn, P. (2012). Production, Purification and Characterization of Inulinase from a Newly Isolated *Streptomyces* sp. CP01. *Natural Resources*.
- Laurenzo, K. S., Navia, J. L., & Neiditch, D. S. (1999). *USA Patente nº 5968365*.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*, 172-173.
- Lee, S. S., Yu, S., & Withers, S. G. (2003). Detailed dissection of a new mechanism for glycoside cleavage: alpha-1,4-glucan lyase. *Biochemistry*, 130811-13090.
- Liu, X.-Y., Chi, Z., Liu, G.-L., Wang, F., Madzak, C., & Chi, Z.-M. (2010). Inulin hydrolysis and citric acid production from inulin using the surface-engineered *Yarrowia lipolytica* displaying inulinase. *Metabolic Engineering*, 469-476.
- López, M., Mancilla-Margalli, N., & Mendoza-Diaz, G. (2003). Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 7835-7840.
- Montañez-Soto, J., Venegaz-González, J., Vivar-Vera, M., & Ramos-Ramírez, E. (2011). Extracción, caracterización y cuantificación de los fructanos contenidos en la cabeza y en las hojas del *Agave tequilana* Weber azul. *Bioagro*, 199-206.
- Morris, C., & Morris, G. A. (2012). The effect of inulin and fructo-oligosaccharide supplementation on the textural, rheological and sensory properties of bread and their role in weigh management: a review. *Food Chem.*, 237-248.
- Nakamura, A., Nishimura, I., Yokoyama, A., Lee, D.-G., Hidaka, M., Masaki, H., . . . Uozumi, T. (1997). Cloning and sequencing of an  $\alpha$ -glucosidase gene from *Aspergillus niger* and its expression in *A. nidulans*. *Journal of Biotechnology*, 75-84.

- Ni, D., Xu, W., Zhu, Y., Zhang, W., Zhang, T., Guang, C., & Mu, W. (2019). Inulin and its enzymatic production by inulosucrase: Characteristics, structural features, molecular modifications and applications. *Biotechnology Advances*, 306-318.
- Nyman, M. (2002). Fermentation and bulking capacity of indigestible carbohydrates: The case of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, S163-S168.
- Paludan-Müller, C., Gram, L., & Rattray, F. P. (2002). Purification and Characterisation of an Extracellular Fructan  $\beta$ -fructosidase from a *Lactobacillus pentosus* Strain Isolated from Fermented Fish. *Systematic and Applied Microbiology*, 13-20.
- Pandey, A., Soccol, C. R., Selvakumar, P., Soccol, V. T., Krieger, N., & Fontana, J. D. (1999). Recent developments in microbial inulinases. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 35-52.
- Park, J. P., & Yun, J. W. (2001). Utilization of chicory roots for microbial endoinulinase production. *Letters in Applied Microbiology*, 183-187.
- Pingoud, A., Alves, J., & Geiger, R. (1993). Restriction Enzymes. *Enzymes of Molecular Biology*, 107-200.
- Praznik, W., Cieřlik, E., & Huber, A. (2003). Fructans: Occurrence and Application in Food. En V. authors, *Chemical and Functional Properties of Food Saccharides* (págs. 197-214). Boca Raton: CRC Press.
- Priest, F. G., Goodfellow, M., Shute, L. A., & Berkeley, R. C. (1987). *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 69-71.
- Promega. (s. f.). *Promega*. Obtenido de Amino Acid Structures, Codes and Reference Information: <https://worldwide.promega.com/resources/tools/amino-acid-chart-amino-acid-structure/>
- Protein Data Bank. (21 de Diciembre de 2004). *PDB: Protein Data Bank*. Obtenido de 1Y9G: Crystal structure of exo-inulinase from *Aspergillus awamori* complexed with fructose: <https://www.rcsb.org/structure/1Y9G>
- Protein Data Bank. (18 de Julio de 2012). *PDB: Protein Data Bank*. Obtenido de 3RWK First crystal structure of an endo-inulinase, from *Aspergillus ficuum*: structural analysis and comparison with other GH32 enzymes: <https://www.rcsb.org/structure/3RWK>
- Roberfoid, M. (1999). Concepts in Functional Foods: The Case of Inulin and Oligofructose. *J. Nutr.*, 1398S-1401S.
- Roberfoid, M., & Slavin, J. (2000). Nondigestible Oligosaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 461-480.
- Rocha, J. R., Catana, R., Ferreira, B. S., Cabral, J. M., & Fernandes, P. (2006). Design and characteristics of an enzyme system for inulin hydrolysis. *Food Chemistry*, 77-82.
- Ruiz-García, C., Béjar, V., Martínez-Checa, F., Llamas, I., & Quesada, E. (2005). *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 191-195.
- Sazerac Company. (s. f.). *Great Agave*. Obtenido de The Anatomy of Agave: <https://greatagave.com/anatomy/>
- Sharma, A. D., & Gill, P. K. (2007). Purification and characterization of heat-stable exo-inulinase from *Streptomyces* sp. *Journal of Food Engineering*, 1172-1178.

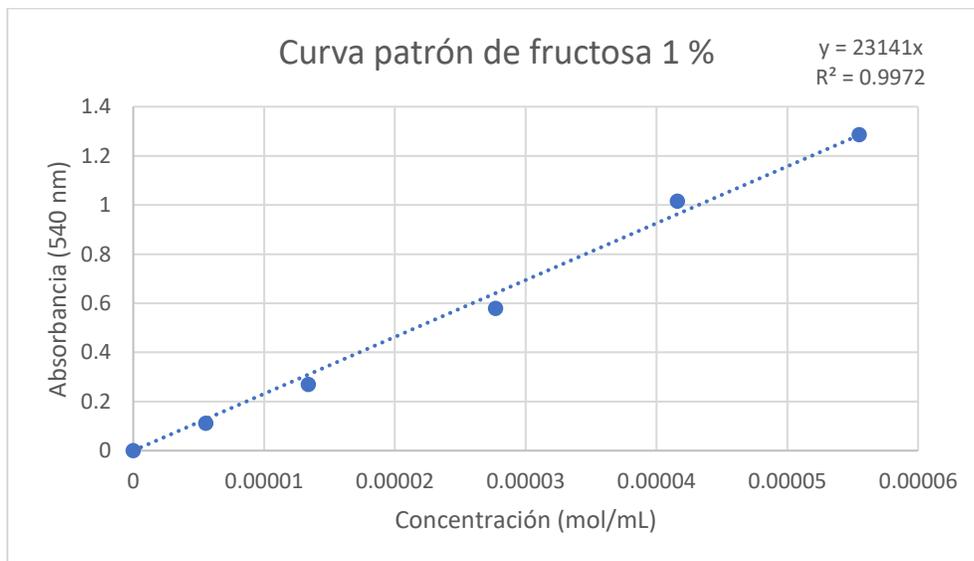
- Sheng, J., Chi, Z., Li, J., Gao, L., & Gong, F. (2007). Inulinase production by the marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the crude inulinase. *Process Biochemistry*, 805-811.
- Singh, R. S., Singh, R. P., & Kennedy, J. F. (2017). Immobilization of yeast inulinase on chitosan beads for the hydrolysis of inulin in a batch system. *International Journal of Biological Macromolecules*, 87-93.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology*. Sunderland: Sinauer Associates.
- Tian, F., & Karboune, S. (2012). Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides by levansucrase from *Bacillus amyloliquefaciens*: specificity, kinetics, and product characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 71-79.
- Treichel, H., Mazutti, M. A., Maugeri, F., & Rodrigues, M. I. (2009). Use of a sequential strategy of experimental design to optimize the inulinase production in a batch bioreactor. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 895-900.
- Ulloa, J. A., Espinoza, A. H., K., G., Rosas, U., P., Ulloa, R., . . . C., J. (2010). Los fructanos y su papel en la promoción de la salud. *Revista Fuente*, 57-62.
- Van den Ende, W., De Coninck, B., & Van Laere, A. (2004). Plant fructan exohydrolases: A role in signaling and defense? *TRENDS in Plant Science*, 523-528.
- Van Loo, J., Coussement, P., & de Leenheer, L. (1995). On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the Western diet. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, 525-552.
- Vandamme, E. J., & Derycke, D. G. (1983). Microbial inulinases: fermentation process, properties and applications. *Adv. Appl. Microbiol.* , 139-176.
- Xu, W., Zhang, L., Goodwin, P. H., Xia, M., Zhang, J., Wang, Q., . . . Yang, L. (2020). Isolation, Identification, and Complete Genome Assembly of an Endophytic *Bacillus velezensis* YB-130, Potential Biocontrol Agent Against *Fusarium graminearum*. *Frontiers in Microbiology*.
- Zhang, L., Zhao, C., Zhu, D., Ohta, Y., & Wang, Y. (2004). Purification and characterization of inulinase from *Aspergillus niger* AF10 expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 272-275.

## Anexos

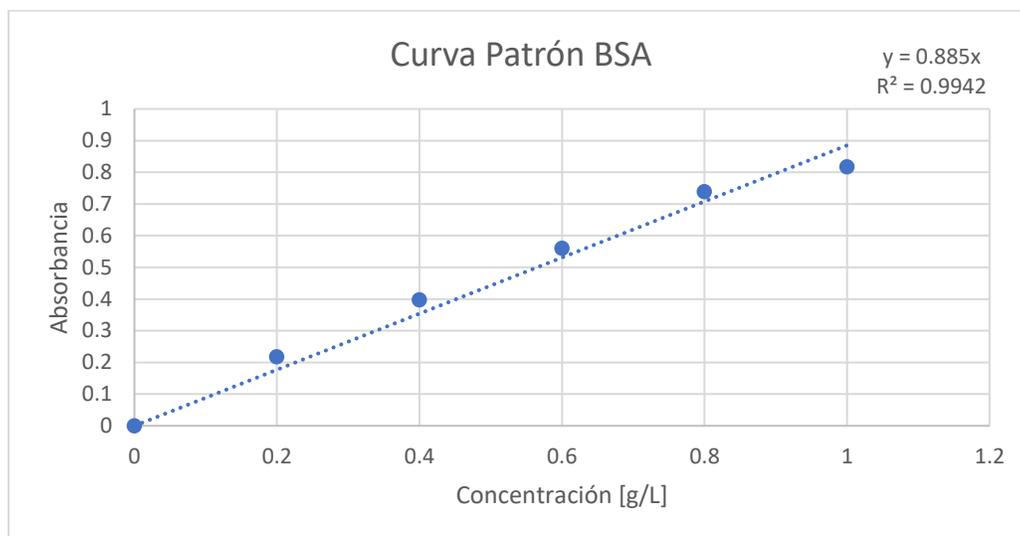
**Anexo 1.** Tabla de datos utilizados para la construcción de la curva patrón de fructosa.

% m/v	mol/mL	$\mu\text{L}$ stock	$\mu\text{L}$ H <sub>2</sub> O	Absorbancia
0	0	0	1000	0
0.1	5.55E-06	100	900	0.111
0.25	1.34E-05	250	750	0.269
0.5	2.77E-05	500	500	0.579
0.75	4.16E-05	750	250	1.016
1	5.55E-05	1000	0	1.287

**Anexo 2.** Curva patrón de fructosa al 1 % utilizada durante el método de cuantificación de azúcares reductores con DNS, mostrando la absorbancia en función de la concentración de fructosa para valores de concentración conocidos en mol/mL. Ecuación lineal y valor de  $R^2$  ubicados en el extremo superior derecho.



**Anexo 3.** Curva patrón de BSA utilizada durante el método de Bradford de cuantificación de proteínas, mostrando la absorbancia en función de la concentración de BSA para valores de concentración conocidos en mg/mL. Ecuación lineal y valor de  $R^2$  ubicados en el extremo superior derecho.



**Anexo 4.** Obtención de la actividad específica [U/mg] de cada fracción con actividad significativa detectada a partir del ensayo de cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC), utilizando una columna de afinidad de níquel (His-Trap™ HP 5 mL).

Fracción 2					
Muestra	Absorbancia		Concentración [ $\mu\text{mol/mL}$ ]	Actividad [U]	Actividad Específica [U/mg]
Control Enzima	-0.005	0	0.0000	0.00000	0.0000
Control	0.004	0.004	0.1729	0.00864	0.3172
Reacción	0.009	0.009	0.3889	0.01945	0.7138
Reacción	0.02	0.02	0.8643	0.04321	1.5862
Fracción 5					
Muestra	Absorbancia		Concentración [ $\mu\text{mol/mL}$ ]	Actividad [U]	Actividad Específica [U/mg]
Control Enzima	-0.004	0	0.0000	0.00000	0.0000
Control	-0.002	0	0.0000	0.00000	0.0000
Reacción	0.01	0.01	0.4321	0.02161	0.7931
Reacción	0.008	0.008	0.3457	0.01729	0.6345
Fracción 18					
Muestra	Absorbancia		Concentración [ $\mu\text{mol/mL}$ ]	Actividad [U]	Actividad Específica [U/mg]
Control Enzima	-0.006	0	0.0000	0.00000	0.0000
Control	0.001	0.001	0.0432	0.00216	0.0793
Reacción	0.103	0.103	4.4510	<b>0.22255</b>	8.1690
Reacción	0.115	0.115	4.9695	<b>0.24848</b>	9.1208
Fracción 19					
Muestra	Absorbancia		Concentración [ $\mu\text{mol/mL}$ ]	Actividad [U]	Actividad Específica [U/mg]
Control Enzima	0	0	0.0000	0.00000	0.0000
Control	-0.001	0	0.0000	0.00000	0.0000
Reacción	0.15	0.15	6.4820	<b>0.32410</b>	11.8967
Reacción	0.117	0.117	5.0560	<b>0.25280</b>	9.2794

Tiempo de reacción	Volumen de reacción	Cantidad de proteína (Bradford)	Enzima añadida en la reacción
20 min	1 mL	0.2724 mg/mL	0.1 mL

**Anexo 5.** Tablas con los valores de actividad específica [U/mg] obtenidos a partir de la evaluación de la actividad enzimática de la inulinasa recombinante a diferentes valores de temperatura, pH y con diferentes sustratos.

Temperatura [°C]	Actividad Específica [U/mg]
40	9.55
45	10.56
<b>50</b>	<b>12.56</b>
55	9.96
60	9.89
65	6.91
70	3.94
80	3.79

pH	Actividad Específica [U/mg]
3	0.85
4	0.26
5	2.04
6	1.52
<b>7</b>	<b>5.76</b>
8	4.83
9	1.67
10	2.12

Sustrato	Actividad Específica [U/mg]
Sacarosa	9.84
<b>Agavina</b>	<b>19.81</b>
<b>Inulina de Achicoria</b>	<b>20.82</b>

Tiempo de reacción	Volumen de reacción	Cantidad de proteína (Bradford)	Enzima añadida en la reacción
20 min	1 mL	0.7266 mg/mL	0.04 mL

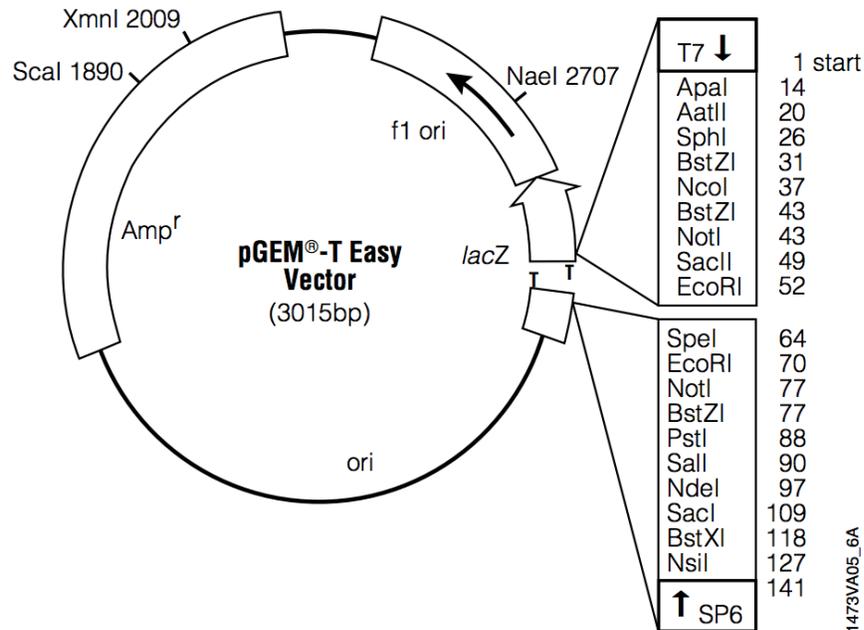
**Anexo 6.** Antecedentes – Obtención de una inulinasa recombinante a partir de una cepa silvestre de *B. velezensis*.

Se extrajo el DNA de la inulinasa silvestre, se evaluó su integridad realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1 % y se llevó a cabo una reacción en cadena de polimerasa (PCR), con el objetivo de amplificar los genes de interés.

**Tabla 16.** Diseño de primers para las reacciones de PCR.

Gen	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño	% GC	Tm (°C)
Levanasa	5' <b>CATATG</b> GYAGCAAATGGCCC	5' CTCGAG CTAAGYATGAATCGAAC	21/23	48/43	55
Inulinasa	5' <b>CATATG</b> GATAGAATTCAGCAG	5' CTCGAG TCAGCTTCTTTTCCAA	21/22	36/43	55
Levansacarasa	5' <b>CATATG</b> AACATCAAAAAAATTGTC	5' CTCGAG TTAGTTGTTAACCGTAA	23/23	26/44	55

Después de corroborar su amplificación, se recuperaron los productos de reacción y se purificó el DNA utilizando un kit de purificación (DNA QIAquick extraction de Qiagen). Posteriormente, se ligaron los genes de interés con el vector pGEM-t easy vector.



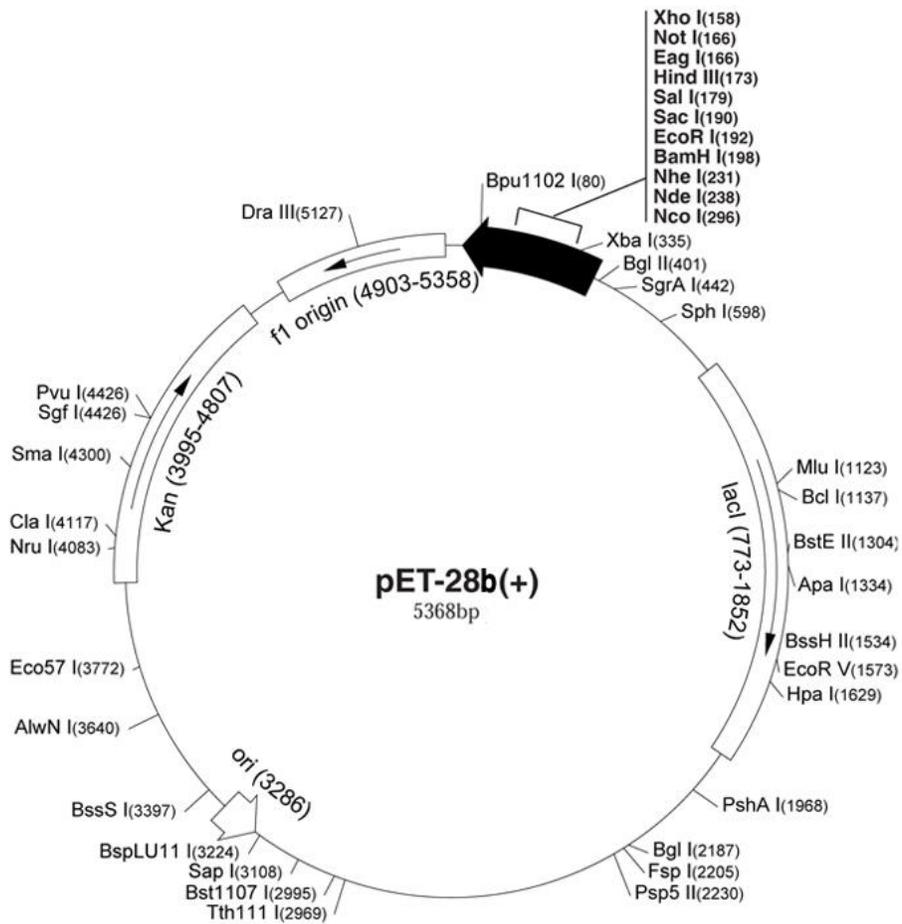
**Figura 26.** Construcción de un vector de clonación pGEM – T Easy Vector.

Para la conservación de los genes de interés y utilizando las construcciones resultantes de las reacciones de ligación previas, se transformaron células de *E. coli DH5α* mediante un choque térmico.

Posteriormente, se llevó a cabo la secuenciación de los genes de interés para confirmar que el inserto correspondiera a éstos, para descartar mutaciones y descubrir su secuencia exacta. El pDNA obtenido fue purificado con ayuda de un kit QIAprep Spin Miniprep de QIAGEN. Para comprobar la presencia del inserto y que éste fuera del tamaño esperado, se efectuaron reacciones de restricción usando las endonucleasas NdeI y XhoI y una posterior electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

Después de comprobar la presencia del inserto, las muestras de pDNA purificado se enviaron a secuenciar al laboratorio Laragen Inc. Allí, se obtuvo la secuencia completa de los genes de interés y se verificó la ausencia de codones de paro prematuros, así como de colonias que no tuvieran un inserto apto para expresión.

Una vez obtenida la colonia transformante óptima para expresión, el inserto fue subclonado en un vector pET28b(+) con el objetivo de lograr la expresión de la proteína. Para este procedimiento, se transformaron células de *E. coli* BL21(DE3), almacenándose para su estudio posterior.



**Figura 27.** Construcción de un vector de expresión pET-28b(+).