



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Purificación y caracterización de una inulinasa proveniente de
Fusarium incarnatum

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Esmeralda Martínez Torres

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Carmina Montiel Pacheco

[Facultad de Química](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra

[Facultad de Química](#)

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco

[Facultad de Medicina](#)

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, marzo, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A DGAPA UNAM por el proyecto PAPIIT IN219520 y a la Facultad de Química PAIP 5000 9153.

Agradecimiento a CONACyT por la beca otorgada para los estudios de maestría.

Agradezco a la Dra. Carmina por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo.

Y al Dr. Javier Plasencia y Dr. Daniel Alejandro Fernández por compartirme sus conocimientos.

***Para mis padres Jorge y Virginia,
en mi memoria y mi corazón siempre...***

INDICE

1. Introducción.....	1
1.1. Agave.....	1
1.2. Fructanos.....	1
1.3. Agavinas	3
1.4. Aplicaciones tecnológicas de las agavinas	4
1.5. Fructooligosacáridos.....	5
1.6. Familia de las glicosil hidrolasas.....	5
1.6.1. Clasificación de las glicosil hidrolasas (GH32, GH43, GH62, GH68)	6
1.6.2. Clan F.....	7
1.6.3. Clan J.....	7
1.6.4. Fructansacararasas	10
1.6.5. Inulinasas.....	11
2. Antecedentes	13
2.1. <i>Fusarium incarnatum</i>	13
2.2. Estudios previos	14
3. Justificación.....	15
4. Hipótesis.....	15
5. Objetivos	15
5.1. Objetivo general.....	15
5.2. Objetivos específicos	16
6. Materiales y Métodos	16
6.1. Metodología análisis in silico	16
6.1.1. Alineamiento múltiple de secuencias.....	16
6.1.2. Construcción de árbol filogenético.....	16

6.1.3. Predicción de la estructura de la inulinasa de <i>F. incarnatum</i>	17
6.1.4. Comparación de los modelos de las estructuras de la inulinasa de <i>F. incarnatum</i>	18
6.2. Metodología del análisis experimental	18
6.2.1. Material celular	18
6.2.2. Reactivos y equipos	18
6.2. Crecimiento de la <i>F. incarnatum</i> CRT 197	20
6.2.3. Determinación de la actividad enzimática inulinasa variado la fuente de carbono del medio de cultivo.....	21
6.2.3. Determinación de la actividad enzimática inulinasa variando la fuente de nitrógeno	22
6.2.4. Determinación de la cantidad de proteína por el método de Bradford .	23
6.2.5. Purificación de la inulinasa de <i>F. incarnatum</i> CRT 197	24
6.2.6. Verificación de la pureza de la inulinasa de <i>F. incarnatum</i> CRT 197 ...	25
6.2.7. Zimograma de la inulinasa de <i>F. incarnatum</i> CRT 197	25
6.2.8. Peso molecular de la inulinasa de <i>F. incarnatum</i> CRT 197.....	26
6.2.9. Determinación de glicosilaciones inulinasa de <i>F. incarnatum</i> CRT 197	26
6.2.10. Determinación de la temperatura óptima de inulinasa de <i>F. incarnatum</i> CRT 197.....	26
6.2.11. Determinación del pH óptimo de la inulinasa de <i>F. incarnatum</i> CRT 197	27
6.2.12. Determinación de la actividad enzimática inulinasa variando el sustrato	27
6.2.13. Cromatografía en capa fina (TLC).....	28
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
7.1. Resultados del análisis in silico	28
7.1.1. Identificación y caracterización molecular de la inulinasa de <i>F. incarnatum</i>	28
7.1.2. Árbol filogenético la inulinasa de <i>F. incarnatum</i>	31
7.1.3. Predicción de la estructura de la enzima de <i>F. incarnatum</i>	35
7.2. Resultados del análisis experimental.....	48

7.2.1 Determinación de la actividad enzimática inulinasa <i>F. incarnatum</i> CRT 197 variando la fuente de carbono.....	48
7.2.3. Determinación de la actividad enzimática inulinasa <i>F. incarnatum</i> CRT 197 variando la fuente de nitrógeno.....	49
7.3. Purificación de la inulinasa de <i>F. incarnatum</i> CRT 197	51
7.3.1. Purificación de la inulinasa por cromatografía de exclusión molecular	51
7.3.3. Monitoreo del proceso de purificación de la inulinasa de <i>F. incarnatum</i> CRT 197.....	55
7.3.3. Zimograma del sobrenadante de <i>F. incarnatum</i> CRT 197	57
7.3.4. Peso molecular de la inulinasa de <i>F. incarnatum</i> CRT 197.....	59
7.3.5 Determinación de la Glicosilación de la inulinasa de <i>F. incarnatum</i> CRT 197.....	60
7.3.6. Determinación de la temperatura óptima para la actividad de la inulinasa de <i>F. incarnatum</i> CRT 197.....	61
7.3.7. Determinación del pH óptimo para la actividad de la inulinasa de <i>F. incarnatum</i> CRT 197	62
7.3.8. Determinación de la actividad enzimática de la inulinasa de <i>F. incarnatum</i> CRT 197 variando el sustrato.....	64
7.3.9. Análisis de los productos de reacción con sacarosa e inulina de agave	66
8. CONCLUSIONES.....	68
9. PERSPECTIVAS.....	69
10. REFERENCIAS.....	69

Índice de figuras

Figura 1. Morfología de la plata de agave	1
Figura 2. Estructura de la inulina y levano	2
Figura 3. Estructura de los fructanos tipo neoserie	2
Figura 4. Estructura de los fructanos tipo graminano	3
Figura 5. Estructura de las agavinas	4
Figura 6. Representación en caricatura de la estructura de una inulinasa de <i>Aspergillus ficcum</i> (PDB 3sc7).....	5

Figura 7. Clasificación de las enzimas glicosil hidrolasas	6
Figura 8. Sitio activo de la exoinulinasa de <i>Aspergillus awamori</i> (PDB 1Y9G)	7
Figura 9. Estructura de la levansacarasa de <i>Bacillus subtilis</i> (PDB 1OYG)	8
Figura 10. Mecanismo de reacción de una invertasa producida por <i>Arabidopsis thaliana</i>	9
Figura 11. Representación del mecanismo de reacción Bi-Bi de una levansacarasa.....	10
Figura 12. Clasificación de las Inulinasas.....	11
Figura 13. <i>F. incarnatum</i> cepa CRT 197.....	13
Figura 14. <i>F. incarnatum</i> cepa CRT 197 en medio de agavina al 1% como fuente de carbono y teñido con Lugol.....	14
Figura 15. Alineamiento múltiple de secuencias basado en la inulinasa de referencia de <i>F. incarnatum</i> FIESC28_ [<i>Fusarium coffeatum</i>].....	30
Figura 16. Árbol filogenético del complejo FIESC a partir del factor TB1 en frutos del melón.....	32
Figura 17. Árbol filogenético de la inulinasa de <i>F. incarnatum</i>	34
Figura 18. Árbol filogenético condensado de las enzimas glicosil hidrolasa de <i>F. incarnatum</i> FIESC28_00105 [<i>Fusarium coffeatum</i>].....	35
Figura 19. Gráficos de PLDDT.....	38
Figura 20. Gráficos de Ramachandran.....	40
Figura 21. Qmean de los modelos de la predicción de la estructura de la inulinasa de <i>F. incarnatum</i> CRT 197.....	41
Figura 22. Alineamientos de la secuencia de aminoácidos de la enzima XP_031019455.1 uncharacterized protein FIESC28_02354 [<i>Fusarium coffeatum</i>].....	43
Figura 23. Modelo final de la predicción de la estructura de la enzima XP_031019455.1	44
Figura 24. Alineamientos de la secuencia de aminoácidos de la enzima XP_031019455.1 uncharacterized protein FIESC28_02354 [<i>Fusarium coffeatum</i>].....	45
Figura 25. Modelo final de la predicción de la estructura de la enzima XP_031021624.1.....	45
Figura 26. Superposición de los modelos de la predicción de la estructura de las de las enzimas.....	46

Figura 27. Superposición de los modelos de la predicción de la estructura en el sitio activo	47
Figura 28. Actividad enzimática inulinasa del sobrenadante de <i>F. incarnatum</i> CRT 197.	49
Figura 29. Actividad enzimática inulinasa de <i>F. incarnatum</i> CRT 197.....	50
Figura 30. Cromatograma de exclusión molecular de la inulinasa de <i>F. incarnatum</i> CRT 197 (concentración de proteínas por precipitación con acetona)	52
Figura 31. Cromatograma de exclusión molecular obtenido en la purificación de la inulinasa de <i>F. incarnatum</i> CRT 197 (concentración de proteínas liofilizando el sobrenadante)	54
Figura 32. Verificación de la pureza de la enzima por electroforesis en gel SDS-PAGE 15%.....	56
Figura 33. Zimograma de inulinasas obtenido por SDS-PAGE 10 % 2 h de reacción.....	57
Figura 34. Zimograma de inulinasas obtenido por SDS-PAGE 10 % 24 h de reacción.....	58
Figura 36. Ensayo de glicosilación de la enzima ET-FIGH de <i>F. incarnatum</i> CRT 197.....	61
Figura 37. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática específica de la inulinasa de la enzima ET-FIGH de <i>F. incarnatum</i> CRT 197.....	62
Figura 38. Actividad enzimática específica de la inulinasa de ET-FIGH de <i>F. incarnatum</i> CRT 197 variando el pH.....	63
Figura 39. Actividad enzimática específica de hidrolisis de la enzima ET-FIGH de <i>F. incarnatum</i> CRT 197 variando el sustrato.....	64
Figura 40. Actividad enzimática específica de la inulinasa de ET-FIGH de <i>F. incarnatum</i> CRT 197 a diferentes temperaturas pH con sacarosa al 1%.....	65
Figura 41. Cromatografía en capa fina TLC con sacarosa.....	66
Figura 42. Cromatografía en capa fina TLC con inulina de agave.....	67

Índice de tablas

Tabla 1. Reactivos utilizados durante la experimentación.....	18
Tabla 2. Equipos utilizados durante la experimentación	20

Tabla 3. Composición del medio de cultivo sólido para el desarrollo de <i>F. incarnatum</i>	20
Tabla 4. Composición de los medios líquidos inoculados con <i>F. incarnatum</i> variando la fuente de carbono	21
Tabla 5. Composición del medio de cultivo líquido para el desarrollo de <i>F. incarnatum</i> variando la fuente de nitrógeno	22
Tabla 6. Modelos de la estructura de la inulinasa de <i>F. incarnatum</i> construidos en Swiss Model	36
Tabla 7. Evaluación local y global del modelo de la predicción de la estructura de la enzima.....	42
Tabla 8. Tabla de la purificación (precipitando la enzima) de la inulinasa de <i>F. incarnatum</i>	53
Tabla 9. Tabla de purificación de la inulinasa de <i>F. incarnatum</i> liofilizando el sobrenadante	55
Tabla 10. Coeficiente de retención K_a de los estándares	59

Resumen

De un conjunto de cepas de *Fusarium* aisladas de las plantas de agave en el estado de Jalisco, se seleccionó a *F. incarnatum* CRT197, para evaluar y caracterizar la producción de inulinasas en *Fusarium sp.*, con base en un estudio previo que demostró por primera vez, que *F. incarnatum* tiene capacidad inulinolítica en medios de cultivo con inulina de agave al 1% como única fuente de carbono.

En este trabajo, se realizó un análisis *in silico* de dos secuencias de proteínas, XP_031019455.1 uncharacterized protein FIESC28_02354 [*Fusarium coffeatum*] y XP_031021624.1 uncharacterized protein FIESC28_00105 [*Fusarium coffeatum*], que presentan características de la familia de las glicosil hidrolasas GH32, GH68, GH43. Estas secuencias sirvieron como referencia para la construcción del árbol filogenético y la predicción de la estructura de la inulinasa de *F. incarnatum*.

La purificación de la inulinasa de *F. incarnatum* CRT 197, se realizó por cromatografía de exclusión molecular, la enzima pura presentó glicosilaciones y un peso molecular de 17 kDa. Además de que esta enzima tiene mayor actividad enzimática inulinasa a temperatura de 50°C y pH de 5.5, sin embargo, al pH y temperatura mayores la enzima pierde alrededor de un 10 % de actividad.

Los productos de la hidrólisis de la inulina de agave, fructooligosacáridos y fructosa, se observaron mediante cromatografía de capa fina (TLC). Por otra parte, también se demostró que la enzima es capaz de llevar a cabo la reacción de transfructosilación de la sacarosa, para probablemente formar un fructano.

1. Introducción

1.1. Agave

Los agaves son plantas perennes, es decir; que su ciclo de vida dura más de dos años. Su morfología externa está constituida por racimos de hojas que forman espirales, estas hojas (pencas) contienen espinas laterales y una espina apical. En la parte inferior de la planta de agave se encuentra el tallo o bola, que posteriormente, al ser retiradas sus hojas, se convertirá en la piña del agave, con la que se lleva a cabo la elaboración del tequila (Figura 1).



Figura 1. **Morfología de la planta de agave**

Los agaves se distribuyen en América y aproximadamente el 70% de las especies de agave son endémicas en nuestro país (Gschaedler *et al.*, 2017). Una de las especies de mayor importancia agroeconómica es el agave tequilana Weber var. Azul, originario del estado de Jalisco, donde se localiza la mayor producción de tequila (García Mendoza, 2007). Los agaves químicamente están compuestos por fibras (10%), sales minerales (2.5%), proteínas (2.5%) y carbohidratos de reserva tipo fructanos (25%) (Botero *et al.*, 2010).

1.2. Fructanos

Los fructanos son polisacáridos que las plantas sintetizan y almacenan como carbohidrato de reserva en distintas partes de la planta. Por ejemplo, en la Achicoria (*Cichorium intybus*) estos polisacáridos se almacenan en la raíz, mientras que en la

planta de Dalia (*Dahlia variabilis*) y la alcachofa de Jerusalem (*Heliantus tuberosus*) estos se acumulan en los tubérculos (Sosa-Herrera *et al.*,2016).

Los fructanos están constituidos por moléculas de fructosa unidas por enlaces β glucosídicos, que se clasifican en:

Lineales, como la inulina con enlaces β (2-1) y la levana con enlaces β (2-6) (Figura 2).

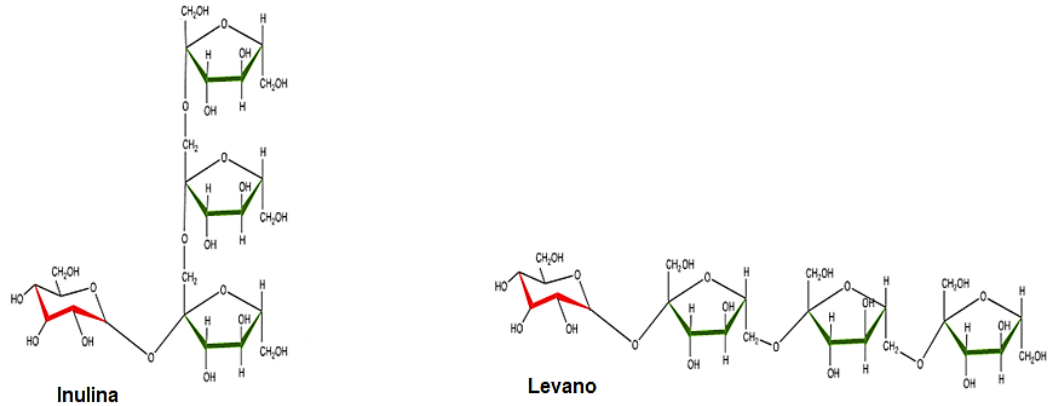


Figura 2. Estructura de la inulina y levano

Los fructanos tipo neoserie, denominados así debido a que la glucosa se encuentra dentro de la estructura química de la molécula. La neo-inulina con enlaces β (2-1) y la neo-levana con enlaces β (2-6), las cuales distingue por tener una glucosa entre dos unidades de fructosa (Figura 3).

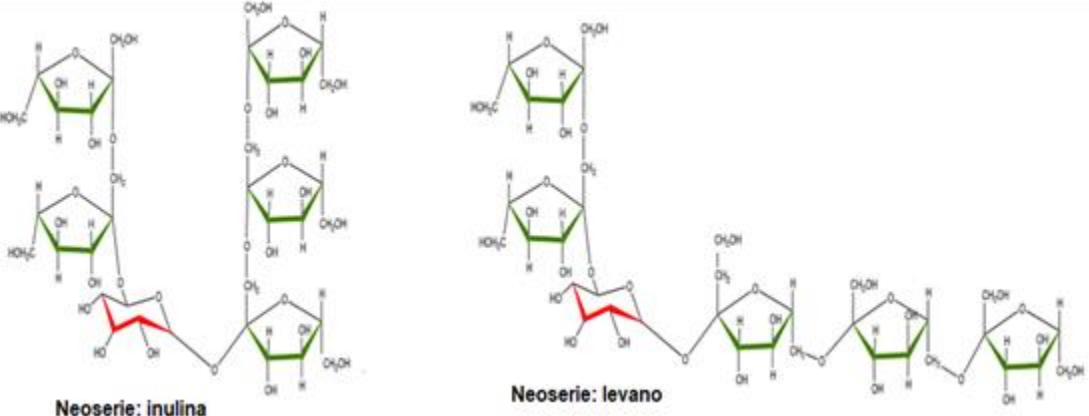


Figura 3. Estructura de los fructanos tipo neoserie

Y los graminanos que son una combinación de fructanos lineales y tipo neoserie, generalmente ramificados (Figura 4).

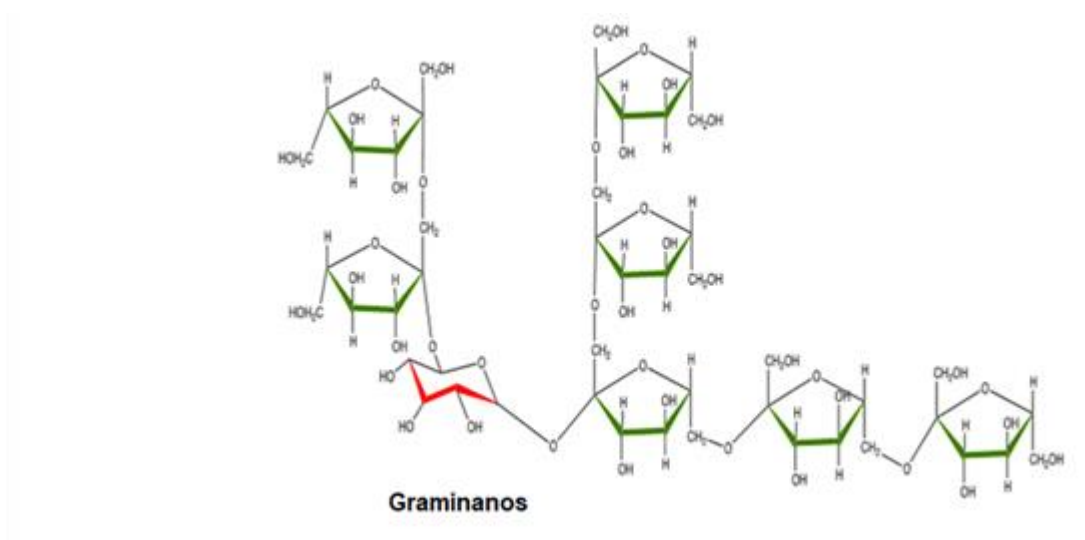


Figura 4. Estructura de los fructanos tipo graminano

1.3. Agavinas

Los fructanos en el agave se descubrieron en los años 50s por Sánchez -Marroquín y Hope, pero en el 2003 López, denominó a estos fructanos como Agavinas. La agavina es una mezcla de fructanos tipo neoserie y de graminanos con ramificaciones que van aumentando con la edad de la planta (Figura 5). El grado de polimerización va de las 3 a las 35 unidades de fructosa (Gschaedler *et al.*, 2017).

Las fructosiltransferasas de plantas son las enzimas responsables de la síntesis de las agavinas, por ejemplo, la sacarosa-sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST) a partir de la sacarosa, transfiere una fructosa a una sacarosa y forma el trisacárido 1-kestosa.

La fructano-fructano 1-fructosiltransferasa (1-FFT), transfiere residuos terminales de fructosa de un fructano a otro fructano formando enlaces β (2-6). La formación de los fructanos tipo neoserie, se lleva a cabo por la enzima fructano-fructano 6G-fructosiltransferasa (6-GFT) (Olvera, *et al.*, 2014).

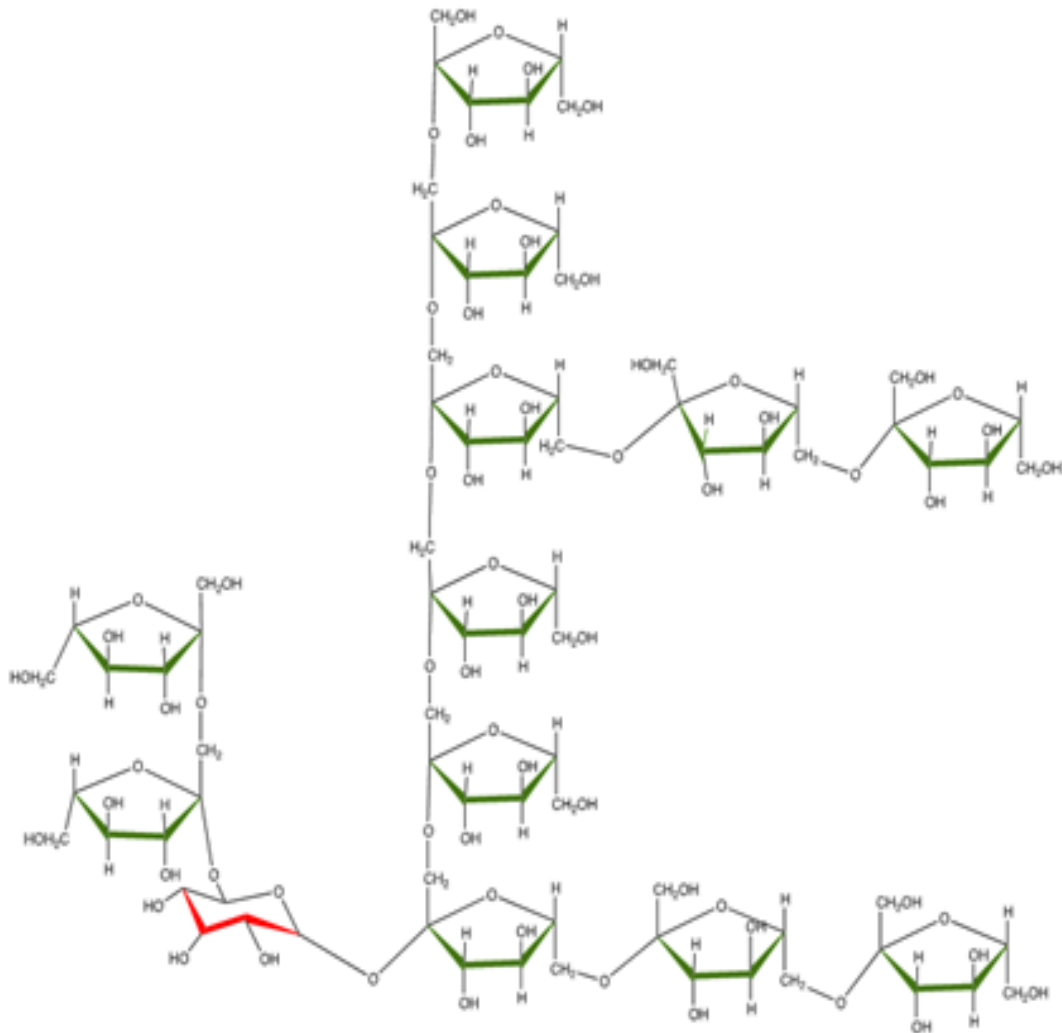


Figura 5. Estructura de las agavinas

1.4. Aplicaciones tecnológicas de las agavinas

En la industria de los alimentos, las agavinas pueden ser utilizadas como fibra dietética y se puede hidrolizar para producir fructosa y fructooligosacáridos. Con la fructosa se elaboran jarabes, que se utilizan como edulcorantes y los fructooligosacáridos se emplean como alimento funcional ya que pueden mejorar la salud gastrointestinal.

1.5. Fructooligosacáridos

Los fructooligosacáridos (FOS) son carbohidratos no digeribles que representan una de las principales clases de oligosacáridos bifidogénicos. Su estructura química consiste en una cadena de unidades de fructosa con una unidad terminal de glucosa, como la 1-kestosa (GF 2), nistosa (GF 3) y 1-fructosil – nistosa (GF 4) (Sabater-Molina, 2009).

Algunas propiedades de los fructooligosacáridos son:

- Alta intensidad de dulzor y no aportan contenido calórico debido a que nuestro cuerpo no contiene las enzimas digestivas que puedan hidrolizar los enlaces beta (β) (Sabater-Molina, 2009).
- Ejercen efecto prebiótico, ya que son fermentados en el colon por la microbiota intestinal y promueven el crecimiento de las bifidobacterias (Sabater-Molina, 2009).
- *Lactobacillus acidophilus* es una bacteria que se encuentra en el intestino y la boca y actúa como probiótico. Dado que los FOS se han utilizado como prebiótico para esta bacteria, se ha reportado una disminución en el crecimiento de *Streptococcus mutans* (Nunpan *et al.*,2019), lo que resulta en una reducción de β -glucanos ácidos e insolubles para la caries dental.

Los FOS pueden obtenerse a partir de la hidrólisis de inulina mediante la acción de enzimas pertenecientes a la familia de las glicosil hidrolasas como las endo-inulinasas, invertasas, y fructosiltransferasas a partir de sacarosa.

1.6. Familia de las glicosil hidrolasas

Las enzimas pertenecientes a la familia de glicosil hidrolasas (GH32, GH43, GH62, GH68) generalmente tienen un dominio beta propela de 5 palas en el amino terminal y un dominio beta sándwich en el carboxilo (Figura 6) (Lu S *et al.*,2020).



Figura 6. Representación en caricatura de la estructura de una inulinasa de *Aspergillus ficcum* (PDB 3sc7). Se observan el dominio beta sándwich y beta propela de cinco palas.

1.6.1. Clasificación de las glicosil hidrolasas (GH32, GH43, GH62, GH68)

Estas enzimas se clasifican en dos clanes: el clan F y el clan J (Figura 7).

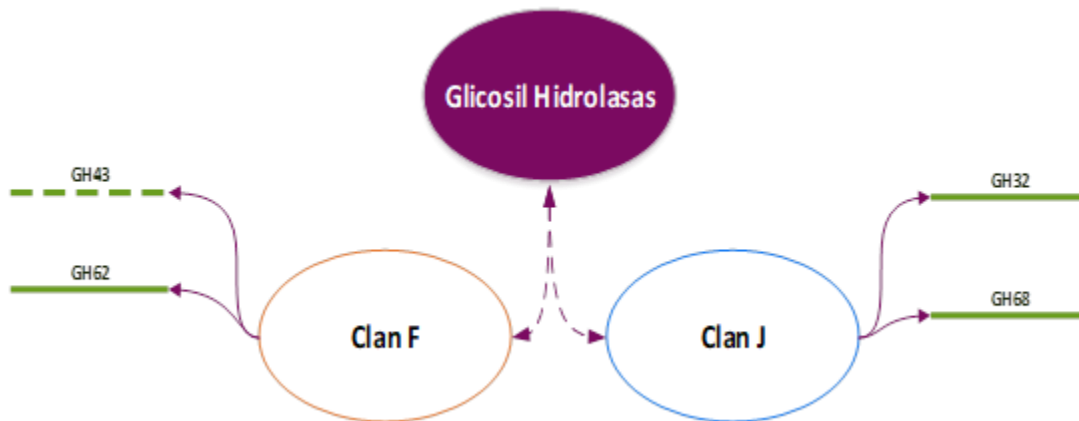


Figura 7. Clasificación de las enzimas glicosil hidrolasas

1.6.2. Clan F

El clan F se divide en dos familias la GH43 y GH62.

La familia GH43 incluye a las β -xilosidasas (EC 3.2.1.37), las β -xilanasas (EC 3.2.1.8) y a las α -L-arabinasas (EC 3.2.1.99) que utilizan xilanos como sustrato.

Mientras que la familia GH62 contiene a la alfa-L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55) que corta específicamente las cadenas laterales α -1,2 o α -1,3-L-arabinofuranosa de los xilanos (Lu S *et al.*,2020).

1.6.3. Clan J

El clan J se divide en dos familias GH32 y GH68.

La familia GH68 incluye a las fructansacarasas como la levansacarasa (EC 2.4.1.10) y la inulosacarasa (EC 2.4.1.9), que usan la sacarosa como sustrato. La familia GH32 incluye a las enzimas sacarosa-6-fosfato hidrolasas, invertasas (EC 3.2.1.26), levanasas (EC 3.2.1.65), fructosiltransferasas eucariotas, fructanotransferasas bacterianas y las inulinasas (EC 3.2.1.7) (Lu S *et al.*,2020).

Las enzimas de la familia GH32 y GH68 contienen tres residuos conservados, dos aspárticos (D) y un glutámico (E), conocidos como la tríada catalítica donde se une el sustrato y se realiza la catálisis (Lu S *et al.*,2020).

En las GH32 estos tres residuos de aminoácidos se localizan en tres motivos conservados “WMNDPNG”, “EC” y “RDP”. Alrededor del centro activo de las enzimas se encuentra, además, una zona aromática conservada, denominada “bolsillo hidrofóbico” (Figura 11), donde se encuentra un residuo de triptófano o fenilalanina, que se localiza dentro de cuatro motivos conservados WMNDPNG, WSGSAT, WGN y WS/GY. Este bolsillo hidrofóbico tiene la función de estabilizar la unión del sustrato (Lafraya, 2011).

Las estructuras de todas las familias de los dos clanes manifiestan un sitio activo en forma de embudo en el dominio β propela (Figura 8).

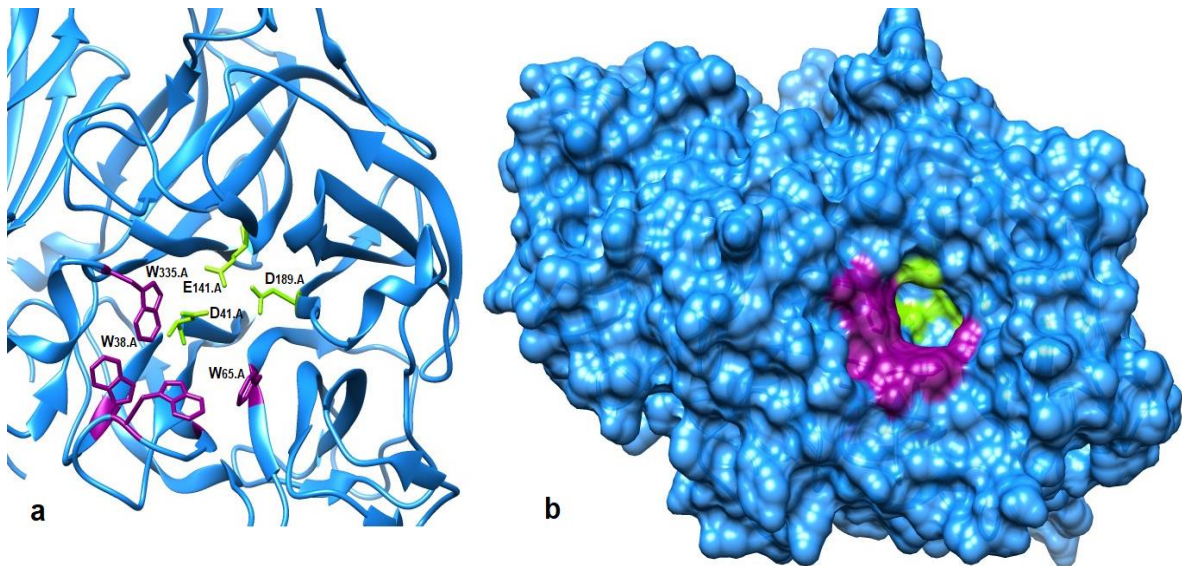


Figura 8. **Sitio activo de la exoinulinasa de *Aspergillus awamori* (PDB 1Y9G).** a) Representación en caricaturas del sitio activo de la exoinulinasa, los residuos de la triada catalítica se muestran en color verde (**D181.A, E141.A, D41.A**) y los residuos aromáticos del bolsillo hidrofóbico en color morado (**W335.A, W38.A, W65.A**). b) Representación en superficie del sitio activo en forma de embudo, con los residuos de la triada catalítica en color verde y los residuos aromáticos del bolsillo hidrofóbico en color morado.

En las enzimas de la familia GH68 todas las estructuras de las levansacararas resueltas por cristalografía como la de *Bacillus subtilis* y *Erwinia amylovora*, solo tienen el dominio beta propela de cinco palas. En el sitio activo en forma de embudo se encuentra la tríada catalítica (Figura 9), dos ácidos aspárticos y un ácido glutámico (Raga-Carbajal *et al.*, 2020).

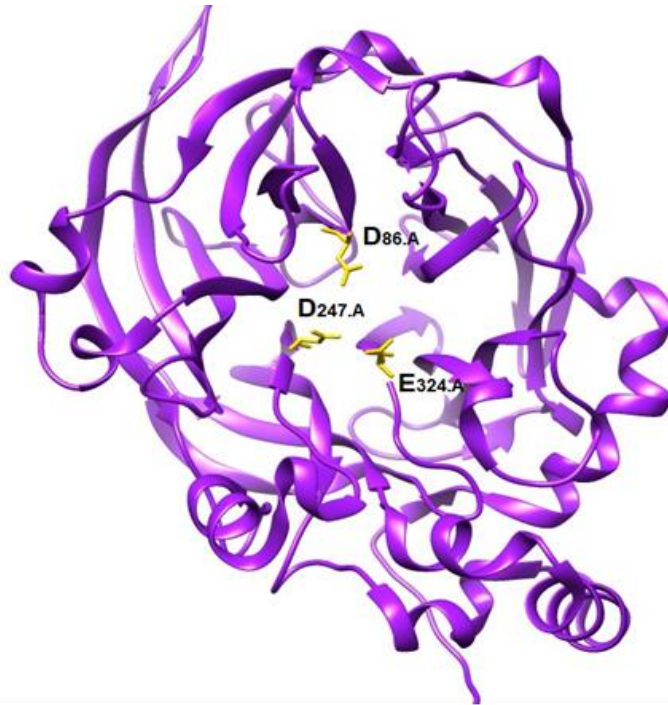


Figura 9. **Estructura de la levansacarasa de *Bacillus subtilis* (PDB 1OYG)**. Representación en caricaturas del sitio activo en donde se muestran los aminoácidos de la triada catalítica en el dominio β -propela, los dos ácidos aspárticos y el glutámico en varillas de color amarillo.

Mecanismo de reacción clan J

Las enzimas del clan J catalizan la hidrólisis del sustrato llevando a cabo una glicosilación y la deglicosilación. Utilizan un intermediario de enzima glicosil covalente: en este caso un ácido aspártico que actúa como el nucleófilo catalítico y un ácido glutámico que tiene la función de ácido/base que estabiliza el estado de transición de la reacción (Figura 10) (Lammens *et al.*, 2009).

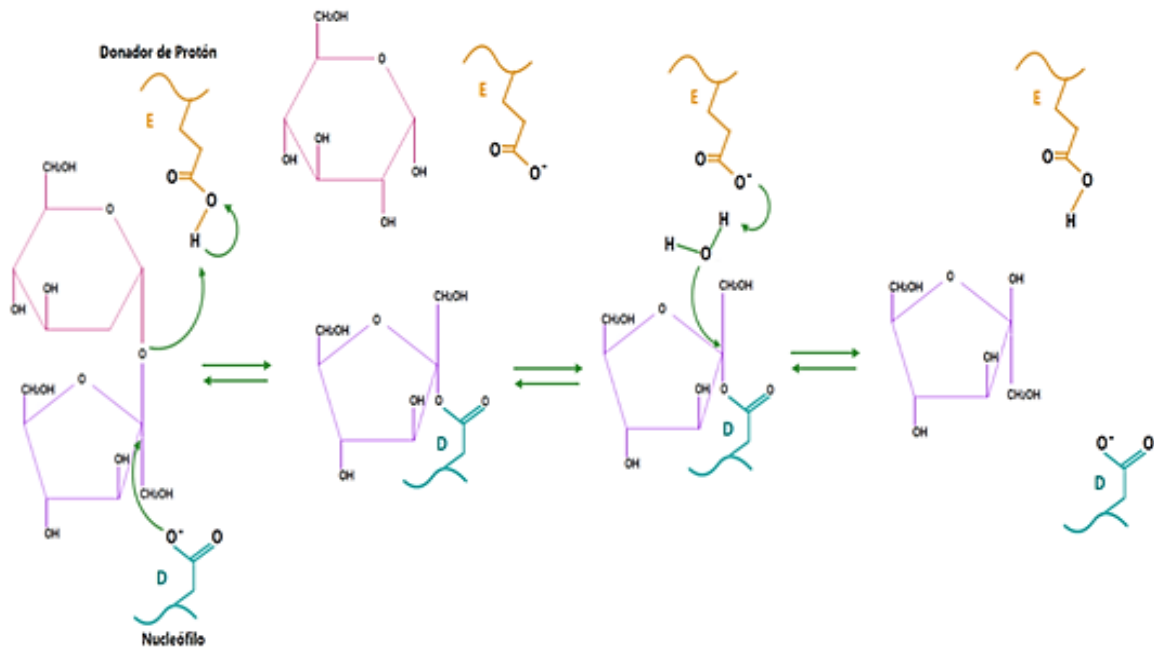


Figura 10. **Mecanismo de reacción de una invertasa producida por *Arabidopsis thaliana*.** El ácido aspártico (D) actúa como nucleófilo y el ácido glutámico (E) como donador de protones en la glicosilación y como aceptor de protones en la deglicosilación (Tomado de Lammens et al., 2009).

1.6.4. Fructansacarasas

Las fructansacarasas son enzimas que transfieren una molécula de fructosa a una de sacarosa o fructano. Pertenecen a la familia GH68 con actividad de transfructosilación. Dentro de las fructansacarasas se encuentra la inulosacarasa (EC 2.4.1.9) que produce inulina y la levansacarasa (EC 2.4.1.10) que produce levanos a partir de la sacarosa.

Las fructansacarasas presentan un mecanismo Bi-Bi ping pong (Figura 11), primero la sacarosa se une a la enzima formando el intermediario fructosilo-enzima y liberando la glucosa; en el segundo paso la molécula aceptora se une al intermediario fructosilo-enzima y ocurren tres tipos de reacciones (Olvera, *et al.*, 2014). Si el aceptor es sacarosa, fructosa o glucosa, se lleva a cabo la reacción de transfructosilación, y la polimerización se produce cuando se trata de una cadena de fructano. La otra reacción es de hidrólisis de la sacarosa si el aceptor es una molécula de agua, por lo tanto, la enzima libera fructosa (Raga-Carbajal, *et al.* 2020).

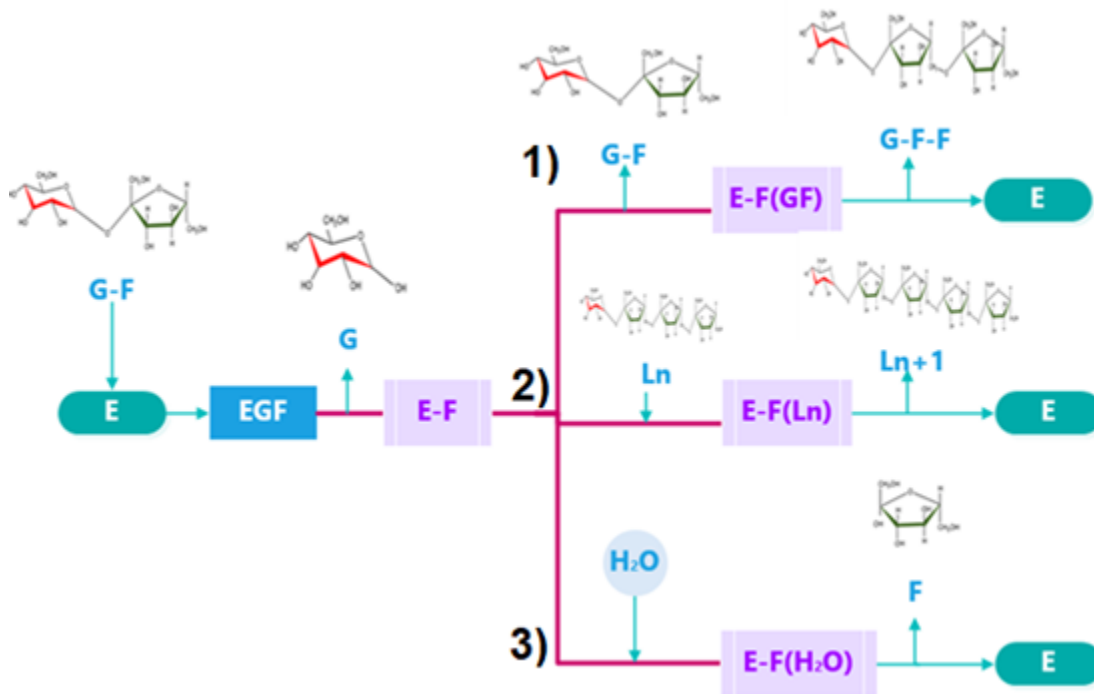


Figura 11. **Representación del mecanismo de reacción Bi-Bi de una levansacarasa.** La enzima (E) se une a la sacarosa (G-F) formando el intermediario enzima-fructosilo (E-F). Ocurriendo tres tipos de reacciones: 1) transfructosilación cuando el aceptor es una sacarosa, 2) polimerización cuando el aceptor es un fructano (L_n), 3) hidrólisis cuando el aceptor es agua (Tomado de Olvera *et al.*, 2014).

1.6.5. Inulinasas

Las inulinasas son enzimas que hidrolizan los enlaces tipo β (2-1) fructosídico y actúan principalmente sobre los polímeros de fructosa. Las inulinasas se clasifican en exoinulinasas y actúan sobre la unidad terminal de fructosa de la inulina liberando fructosa; y las endoinulinasas actúan aleatoriamente en el enlace interno fructosídico de la inulina y producen fructooligosacáridos (Figura 12).

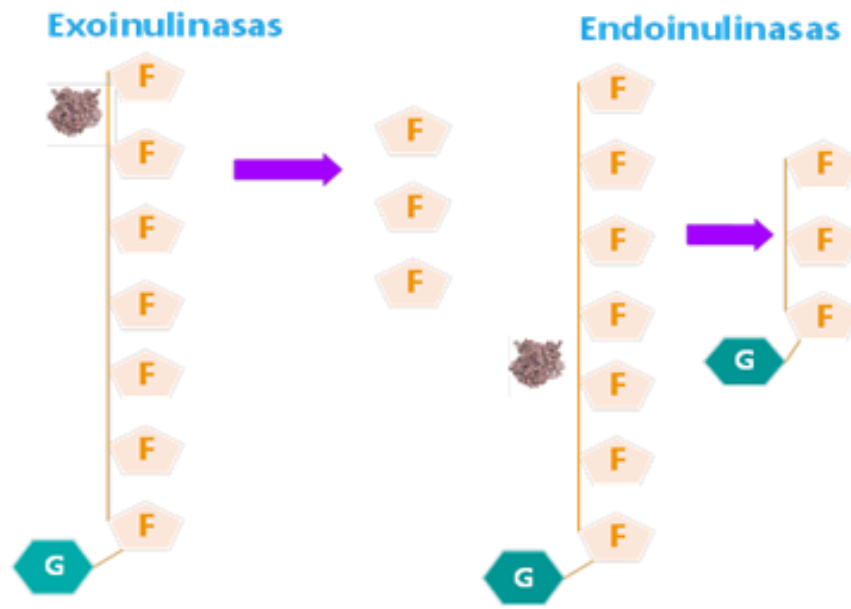


Figura 12. **Clasificación de las Inulinasas.** a) La exoinulinasa hidroliza el enlace beta fructosídico de los polímeros de fructosa. b) La endoinulinasa actúa aleatoriamente en la inulina produciendo fructooligosacáridos.

Microrganismos productores de inulinasas

Las inulinasas se pueden obtener de diversos microorganismos como: hongos, levaduras y bacterias (Tabla 1). Los microorganismos más empleados para la producción de estas enzimas son *Aspergillus sp.* y *Kluyveromyces sp.* Debido a que con estos microorganismos se obtiene mayor actividad enzimática inulinasa. Por ejemplo *A. ficcum* tiene actividad enzimática de 3000 U/mL y cepas como *K. marxianus* CBS 6556, 58000 U/mL (Ricca *et al.*,2007).

Actualmente se emplea *Aspergillus niger* para producir la enzima comercial Fructozyme L (Novozymes, Novo Nordisk), que contiene exo y endoinulinasas. Otra endoinulinasa comercial producida por *A. niger* es Novozyme ®960 (Novozymes, Novo Nordisk). Estas enzimas comerciales son especializadas en la hidrólisis de fructanos lineales tipo inulina como los de achicoria (Gschaedler *et al.*, 2017).

2. Antecedentes

Debido a la baja preferencia de las inulinasas comerciales por hidrolizar fructanos de agave, nuestro grupo de trabajo ha incursionado en la búsqueda de enzimas con capacidad de hidrolizar fructanos complejos como las agavinas. Para esto se ha realizado el aislamiento y caracterización de microorganismos provenientes del bagazo de agave, así como del agave mismo, que utilizan a la agavina como única fuente de carbono.

Entre los microorganismos aislados se encuentran *Kluyveromyces marxianus*, *Bacillus velezensis* y *Fusarium incarnatum*, todos con la capacidad de producir enzimas que hidrolizan a la inulina de agave.

Se ha reportado que las enzimas producidas por la levadura *K. marxianus* son más eficaces en la obtención de fructosa a partir de fructanos de agave comparado con las enzimas comerciales Fructozyme® y Novozyme 960® (Gschaedler *et al.*, 2017). Trapala (2020) reportó que la enzima proveniente de *K. marxianus* ISO3 es 30 veces más eficiente para hidrolizar agavina que otras cepas de este microorganismo. En cuanto a *B. velezensis*, se ha demostrado que es capaz de producir tres enzimas: una inulinasa, una levanasa y una levansacarasa (Abad, 2022).

Sin embargo, es importante continuar con la búsqueda de nuevas enzimas provenientes de otros microorganismos que sean capaces de hidrolizar a los fructanos de agave de manera eficiente. Estas inulinasas pueden ser las provenientes de *F. incarnatum*.

2.1. *Fusarium incarnatum*

F. incarnatum es un hongo filamentoso perteneciente al subreino Dikarya filo Ascomicota, clase Sordariomycetes, orden de los Hypocreales, familia Nectriaceae y género *Fusarium* (Figura 13). Es una especie patógena, parásita y saprofita; que infecta cultivos de sorgo, arroz y agave, se desarrolla en todas las partes vegetativas y reproductivas de las plantas a las que infecta.



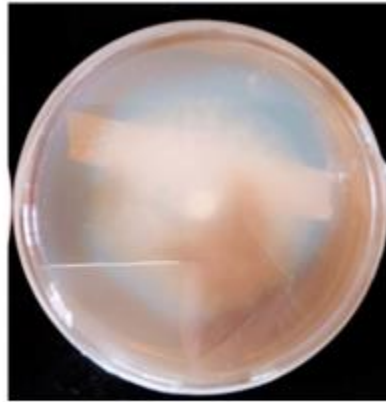
Figura 13. *F. incarnatum* cepa CRT 197. En agar PDA los cultivos de *F. incarnatum* generalmente crecen rápidamente y producen abundantes micelios aéreos que son de color blanquecino.

F. incarnatum produce toxinas como el deoxinivalenol, fumonisina (Gupta, 2017), y zearalenona (Carillo *et al.*, 2007). Además de que forma un complejo con otra especie del mismo género llamado *Fusarium-equiseti* (FIESC) y filogenéticamente incluye más de 30 especies.

2.2. Estudios previos

Previamente en nuestro laboratorio se realizaron estudios sobre la evaluación de inulinasas en cepas de *Fusarium sp.* que fueron aisladas de plantas de agave en Jalisco por el Consejo Regulador del Tequila (Mendoza, 2021).

La cepa CRT 197 fue identificada como *Fusarium incarnatum*, por el grupo de investigación a cargo del Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra; esta cepa se eligió para evaluar y caracterizar la producción de inulinasas en *Fusarium sp.*, en base a que el estudio demostró por primera vez la capacidad inulinolítica de *F. incarnatum* (Figura 14) en medios de cultivo con inulina de agave al 1.0% como única fuente de carbono (Miguel Nava, 2020).



Cepa CRT-197

Figura 14. *F. incarnatum* cepa CRT 197 en medio de agavina al 1% como fuente de carbono y teñido con lugol. Alrededor del crecimiento del hongo se observa la formación de un halo y sin coloración en el medio, debido a que el lugol no reacciona con azúcares simples como a fructosa, demostrando actividad inulinolítica (Tomado de Miguel Nava, 2020).

3. Justificación

La importancia de este proyecto radica en estudiar y analizar a las enzimas con actividad inulinasa producidas por *F. incarnatum*, con la finalidad de obtener una enzima que produzca fructosa o fructooligosacáridos.

4. Hipótesis

F. incarnatum es un microorganismo capaz de crecer en el agave y consumir fructanos como única fuente de carbono, por tanto, será capaz de producir una enzima con actividad exo o endoinulinasa.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Identificar y analizar a la o las enzimas con actividad inulinasa de *F. incarnatum*, mediante su purificación y caracterización.

5.2. Objetivos específicos

Analizar la filogenia molecular de la inulinasa de *F. incarnatum* para ver la presencia en la evolución.

Determinar el modelo estructural la inulinasa de *F. incarnatum* a partir de su predicción estructural.

Implementar las condiciones para purificar la (s) inulinasa (s) de *F. incarnatum*.

Determinar las mejores condiciones de reacción de la inulinasa de *F. incarnatum* y comparar con los reportados para el género *Fusarium*.

6. Materiales y Métodos

6.1. Metodología análisis in silico

En la base de datos de proteínas NCBI se realizó una búsqueda de enzimas de *F. incarnatum*, pertenecientes a la familia de las glicosil hidrolasas (GH32, GH43, GH62 y GH68). Se seleccionaron dos enzimas XP_031019455.1 uncharacterized protein *FIESC28_02354* [*Fusarium coffeatum*] y XP_031021624.1 uncharacterized protein *FIESC28_00105* [*Fusarium coffeatum*], de acuerdo a la clasificación de proteínas e identificación de dominios conservados en la página NCBI.

6.1.1. Alineamiento múltiple de secuencias

Con las secuencias de aminoácidos de las enzimas XP_031019455.1 y XP_031021624.1, se realizó un BLAST en la base de datos NCBI, para recopilar secuencias similares de enzimas, posteriormente se descargaron en formato FASTA y se llevó a cabo el alineamiento múltiple de las secuencias, en el software MEGA-X utilizando el alineamiento ClustalW.

6.1.2. Construcción de árbol filogenético

En el programa MEGA-X con el alineamiento múltiple de secuencias realizado, se construyó el árbol filogenético de las enzimas XP_031019455.1 y XP_031021624.1 utilizando el método de Neighbour joining y Máxima parsimonia, y los parámetros de reconstrucción filogenética Bootstrap a 500 réplicas (Felsenstein, 1985).

6.1.3. Predicción de la estructura de la inulinasa de *F. incarnatum*

Modelado por homología

Basándose en el análisis filogenético de las posibles enzimas hipotéticas pertenecientes a la familia de las glicosil hidrolasas de *F. incarnatum* (FIESC28 [*Fusarium coffeatum*]), se construyó el modelado por homología de la estructura de la enzima en el servidor Swiss-Model y Phyre2 (Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0.).

Primero se realizó la construcción del modelo (Build model) copiando la secuencia de aminoácidos, y seleccionando la opción de búsqueda de plantados (Search for templates). La búsqueda por plantados se basa en el modelado comparativo ProMod3 (Studer *et al.*, 2021) que extrae la información estructural de la plantilla del Protein Data Bank. Los modelos finales se seleccionan en base a los estadísticos de puntuación de fuerza media. Si no se encuentran modelos de la estructura se utiliza la técnica de Monte Carlo y las cadenas laterales no conservadas se modelan con los datos de la biblioteca de rotámeros, estos se estiman con el algoritmo TreePack, finalmente se minimiza la energía de la estructura para resolver las interacciones desfavorables y choques entre aminoácidos, el campo de fuerza que utiliza ProMod3 es CHARMM22/CMAP que consiste en un archivo de parámetros de campo de fuerza CHARMM y contiene todas las constantes numéricas para evaluar fuerzas y energías para proteínas (Mackerell, 2004).

AlphaFold

De la misma manera se hizo una nueva construcción del modelo de predicción de la estructura utilizando ColabFold: AlphaFold2 usando MMseqs2, este servidor utiliza un método computacional que puede predecir el modelo de la estructura de las proteínas.

La secuencia se trasladó al script de AlphaFold2 y se corrió el programa para generar los modelos. Los modelos de la predicción de la estructura, se evaluaron en el servidor Swiss-Model (structure assessment) para validar el modelo.

En Chimera 1.15 se realizó la minimización de la estructura de la proteína para mejorar la calidad del modelo. Posteriormente se hizo la evaluación local y global de la estructura de la proteína utilizando el servidor Swiss-Model (structure assessment) para validar el modelo utilizando la herramienta MolProbity. En PyMOL se hizo la identificación de los dominios conservados de la enzima, y la presentación de la enzima para su visualización.

6.1.4. Comparación de los modelos de las estructuras de la inulinasa de *F. incarnatum*

La comparación de las estructuras y de los dominios conservados se realizó con los modelos elegidos. Finalmente se presentó el mejor modelo de la predicción de la estructura visualizada en PyMOL.

6.2. Metodología del análisis experimental

6.2.1. Material celular

La cepa CRT-197 *F. incarnatum* que se empleó en este trabajo fue amablemente proporcionado por el Consejo Regular del Tequila. Esta cepa fue aislada del Agave tequilana Weber *var. Azul*, en Jalisco.

6.2.2. Reactivos y equipos

Tabla 1. Reactivos utilizados durante la experimentación

Reactivos	
Inulina de Agave (METLIN)	Acetato de sodio (J.T. Baker)
D-Fructosa (SIGMA)	Citrato de Sodio (J.T. Baker)
D-Xilosa (Sigma-Aldrich)	Fosfato de sodio monobásico (J.T. Baker)
Sacarosa (SIGMA)	Fosfato de sodio dibásico (J.T. Baker)
Xilano from Birchwood (SIGMA)	Glicina (SIGMA)
Fructooligosacáridos	Acrilamida (SIGMA)
Levano	N, N-Metilenbisacrilamida (SIGMA)
Nitrato de potasio (KNO ₃) (Reasol)	Azul de Comassie (SIGMA)

Fosfato monopotásico (KH_2PO_4) (Mallinckrodt AR)	Azul de bromofenol (Sigma-Aldrich)
Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich)	Tiosulfato de sodio (Monterrey)
Cloruro de sodio (NaCl) (SIGMA)	Carbonato de sodio (J.T. Baker)
Sulfato de Amonio (NH_4) ₂ SO_4) (Meyer)	Nitrato de plata
Nitrato de Sodio (NaNO_3)	2,3,5-cloruro de trifenil tetrazolio (TTC) (SIGMA)
Extracto de levadura (Sigma-Aldrich)	Persulfato de amonio (SIGMA)
Extracto de Carne (Sigma-Aldrich)	Reactivo de Shiff (SIGMA)
Peptona (Sigma-Aldrich)	Ácido peryodico (Merck)
Ácido sulfúrico Sigma-Aldrich)	Metabisulfito de sodio
Ácido acético (Reproquifin)	Albumina bovina (SIGMA)
Ácido clorhídrico (Sigma-Aldrich)	Albumina sérica bovina (SIGMA)
Metanol (IsaaQuim)	Peroxidasa de rábano (SIGMA)
Etanol (Meyer)	Reactivo de Bradford (Bio Rad)
Butanol (J.T. Baker)	Ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) (SIGMA)
Acetona (Meyer)	Glicerol (Sigma-Aldrich)
Isopropanol (Meyer)	Hidróxido de sodio (Conquimex)
Sulfato dodecil sódico (SDS) (SIGMA)	Marcador de peso molecular de proteínas (Bio Rad)
Orcinol Sigma-Aldrich)	N, N, N', N'-Tetrametiletildiamina
Trizma (SIGMA)	Cromatoplaca de TLC Sílica gel 60 F254

Tabla 2. Equipos utilizados durante la experimentación

Equipos	
Centrifuga 5415 C Eppendorf	Autoclave de esterilización Hirayama
Espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS Thermo Scientific	TermoMixer C 1.5 mL Eppendorf
Vortex Fisher Brand	Incubadora Innova 4330
Centrifuge Pro Research by Centurion Scientific Ltd	Amicon Ultra-15, membrana PLTK Ultracel-PL, 30 kDa
Purificador Agua MiliQ Simplicity UV Milipore	Columna Superdex 200 30 mL
Liofilizadora Heto FD 1.0	FPLC AKTA GE
Potenciómetro Beckman	Balanza analítica (Scout)
Cámara de electroforesis Biorad	Branson 2510 Ultrasonic Cleaner NIST

6.2. Crecimiento de la *F. incarnatum* CRT 197

La cepa de *F. incarnatum* creció en un medio de cultivo Papa-Dextrosa (PDA; 0.5 X) se incubó a 28°C bajo luz fluorescente por 7 días, con la finalidad de comprobar su viabilidad. Posteriormente se tomó un cuadro de agar con micelio de aprox. 0.5 cm y se inoculó en el centro de un medio de cultivo sólido con inulina de agave al 1% como única fuente de carbono (Tabla 3). Las cajas inoculadas se incubaron a 30°C por 190 horas.

Tabla 3. Composición del medio de cultivo sólido para el desarrollo de *F. incarnatum*

Composición	%(p/p)
Inulina de agave	1.0
Nitrato de potasio (KNO₃)	0.36
Fosfato monopotásico (KH₂PO₄)	0.1
Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO₄·7H₂O)	0.05
Cloruro de sodio (NaCl)	0.038
Agar bacteriológico	1.5

6.2.3. Determinación de la actividad enzimática inulinasa variando la fuente de carbono del medio de cultivo

Inoculación de los medios de cultivo con la cepa CRT 197 de *F. incarnatum*

Para determinar la actividad enzimática variando la fuente de carbono del medio de cultivo. Se tomó un cuadro de 0.5 cm de micelio de los medios de cultivo sólidos previamente inoculados con *F. incarnatum* CRT 197 y se llevaron a medios de cultivo líquidos con fuentes de carbono variadas: sacarosa, inulina de agave e inulina de achicoria (Tabla 4) e incubados a 30° C por 190 horas.

Tabla 4. Composición de los medios líquidos inoculados con *F. incarnatum* variando la fuente de carbono

Composición	% (m/v)
Fuente de carbono	1.0
Nitrato de potasio	0.36
Fosfato monopotásico	0.1
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.05
Cloruro de sodio	0.038

Cada 24 horas se tomaron muestras de 1.5 mL de los medios de cultivo durante las 190 horas de incubación.

Determinación de la actividad enzimática por el método DNS

La actividad enzimática de las muestras se determinó por el método DNS; para ello se preparó una solución de inulina de agave al 1% en buffer de fosfatos 50 mM pH 5. Las muestras, se centrifugaron a 14000 rpm por 5 minutos. Se tomaron 500 µL del sobrenadante en un tubo eppendorf y se agregó 500 µL de la solución de inulina de agave al 1% para comenzar la reacción enzimática. Se preparó un tubo control con 500 µL de solución de inulina de agave y 500 µL de agua destilada. Los tubos

se incubaron a 50°C a 400 rpm por 2 horas. Transcurrido ese tiempo se tomaron 100 µL de cada tubo eppendorf en tubos de ensayo (por triplicado), se agregaron 200 µL de buffer de fosfatos 50 mM pH 5 y 600 µL de reactivo DNS

Los tubos de ensayo se sometieron a un baño de glicerol a 90°C por 5 minutos, posteriormente se realizó un choque térmico en hielo por 10 minutos para detener la reacción. Se realizó una curva patrón de fructosa (0-1 mg/mL), para determinar la actividad enzimática y esta se expresó en Unidades. Una unidad de inulinasa fue definida como la cantidad de enzima que produce 1.0 µmol de fructosa por minuto bajo las condiciones de reacción establecidas. Se midió la absorbancia de cada tubo a 540 nm.

6.2.3. Determinación de la actividad enzimática inulinasa variando la fuente de nitrógeno

Inoculación de los medios de cultivo con la cepa F. incarnatum CRT 197

Para determinar la actividad enzimática de la cepa de *F. incarnatum* se inoculó en medios de cultivo líquido con inulina de agave al 1% y con seis fuentes de nitrógeno: extracto de levadura, nitrato de potasio, nitrato de sodio, extracto de carne, sulfato de amonio y peptona (Tabla 5). Estas fueron incubadas a 30°C por 190 horas.

Tabla 5. Composición del medio de cultivo líquido para el desarrollo de *F. incarnatum* variando la fuente de nitrógeno

Composición	% (m/v)
Inulina de agave	1.0
Fuente de nitrógeno	0.36
Fosfato monopotásico	0.1
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.05
Cloruro de sodio	0.038

Se tomaron muestras por duplicado de 1.5 mL de cada de medio de cultivo durante el tiempo de incubación.

Determinación de la actividad enzimática por el método DNS

Por el método DNS se realizó una curva patrón de fructosa para determinar la actividad enzimática. Posteriormente la actividad enzimática de las muestras se determinó por el método DNS; para ello se preparó una solución de inulina de agave al 1% en buffer de fosfatos 50 mM pH 5.

Las muestras, se centrifugaron a 14000 rpm por 5 minutos. Se tomaron 0.5 mL del sobrenadante en un tubo pepenador y se agregó 0.5 mL de la solución de inulina de agave al 1% para comenzar la reacción enzimática. Se preparó un tubo control con 0.5 mL de solución de inulina de agave y 0.5 mL de agua destilada. Los tubos se incubaron a 50°C con agitación a 400 rpm por 2 horas.

Transcurrido ese tiempo se midió la hidrólisis enzimática por medio de la reacción de DNS.

6.2.4. Determinación de la cantidad de proteína por el método de Bradford

Para la determinación de la concentración de proteína producida por *F. incarnatum* CRT 197, se realizó una curva patrón de albumina sérica bovina (BSA) a una concentración de 1mg/mL. Para realizar la cuantificación de las proteínas se utilizó el método de Bradford.

Las muestras recolectadas de 24 horas de cada medio del cultivo con las distintas fuentes de nitrógeno, fueron centrifugadas y con el sobrenadante se realizó la determinación.

Se agregó 100 µL de muestra, 200 µL de reactivo de Bradford, se homogeneizaron en un vortex. Posteriormente se dejaron reposar por 5 minutos. Se midió la absorbancia de cada muestra por triplicado a 595 nm.

6.2.5. Purificación de la inulinasa de *F. incarnatum* CRT 197

Para lograr la purificación de la enzima, *F. incarnatum* se creció en un medio de cultivo líquido con inulina de agave al 1% como única fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno, durante 190 horas a 30°C y 200 rpm. Terminado el tiempo de incubación el micelio fue separado por centrifugación a 9500 rpm por 15 min a 4°C.

Posteriormente la enzima se precipitó utilizando acetona en partes iguales a - 20°C durante 24 horas (Diagrama 1), terminado el proceso la proteína se recuperó por centrifugación 9500 rpm por 15 min a 4°C, el sobrenadante fue decantado y posteriormente el pellet fue resuspendido en 2 mL de buffer de fosfatos pH 6 y 50 mM.

De acuerdo con los análisis *in silico* realizados anteriormente se determinó que la enzima podría tener un peso molecular aproximado de 60 kDa y además otra probable enzima de la familia de las glicosil hidrolasas con un peso molecular de 27 kDa. Por ello la purificación de la enzima se llevó a cabo por cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna Superdex 200, y como fase móvil buffer de fosfatos pH 6 conteniendo 500 mM de NaCl. El flujo de carga de la muestra fue de 0.5 mL/min.

En cada paso de la purificación se determinó la actividad enzimática por el método DNS y la cuantificación de proteína por el método de Bradford. Las fracciones recolectadas se sometieron a diálisis utilizando buffer de fosfatos pH 6 y 50 mM de NaCl durante 24 horas para quitar las sales.

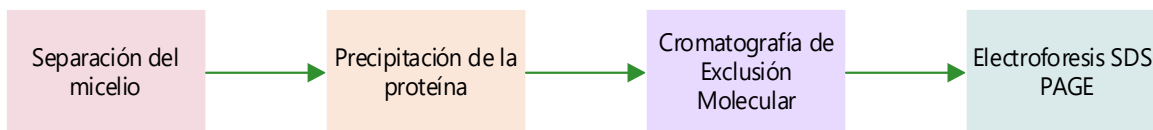


Diagrama 1. **Diagrama de flujo de la purificación de la enzima de *F. incarnatum* CRT-197.** Concentrando la enzima por precipitación con acetona y purificando por cromatografía de exclusión molecular.

Se realizó un segundo método de concentración de proteína para mejorar el rendimiento de obtención de la enzima pura, para ello se realizó la separación del

micelio por centrifugación a 9500 rpm y 4°C, el sobrenadante se recolectado fue congelado y posteriormente liofilizado (Diagrama 2).

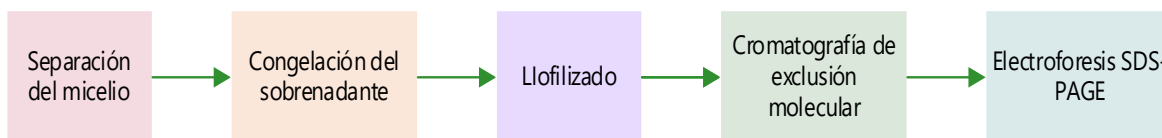


Diagrama 2. **Diagrama de flujo de la purificación de la enzima de *F. incarnatum* CRT-197.** Concentrando la enzima por liofilización del sobrenadante y purificando por cromatografía de exclusión molecular.

La muestra concentrada fue resuspendida en 1.5 mL de agua destilada y fue separada por cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna Superdex 200, y como fase móvil buffer de fosfatos pH 6 conteniendo 500 mM de NaCl. El flujo de carga de la muestra fue de 0.5 mL/min.

6.2.6. Verificación de la pureza de la inulinasa de *F. incarnatum* CRT 197

Para revisar el proceso de purificación de la enzima, se determinó la concentración de proteínas en cada una de las fracciones obtenidas durante la purificación, utilizando el método de Bradford. Una vez que se determinó la cantidad de proteína en cada fracción, se verificó la pureza de la enzima por electroforesis SDS-PAGE.

Las fracciones recolectadas se liofizaron y fueron resuspendidas en agua destilada. Se realizó la electroforesis SDS-PAGE al 15% utilizando 20 µg/µl de proteína del sobrenadante, el liofilizado, y las fracciones obtenidas de la purificación. Se visualizó a la proteína pura con azul de Comassie.

6.2.7. Zimograma de la inulinasa de *F. incarnatum* CRT 197

Para conocer el peso molecular de la inulinasa se realizó un zimograma, se utilizó el sobrenadante liofilizado y se corrió un gel en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE al 10% con 20 µg/µL de proteína, posteriormente se renaturalizó la enzima en buffer de acetatos 50mM pH 5. Para comenzar la reacción enzimática, se preparó una solución de inulina de agave al 8% en buffer de acetatos 50mM pH 5, el gel se incubó en esta solución a 50°C por 24 horas a 70 rpm.

Para revelar los productos de la reacción enzimática, el gel se lavó con agua destilada y se le agregó una solución de cloruro de trifenil tetrazolio (TTC) al 0.2 % m/v en 100mM de NaOH y calentando a 100°C hasta la tinción del gel.

6.2.8. Peso molecular de la inulinasa de *F. incarnatum* CRT 197

Una vez realizada la verificación de la pureza y el zimograma de la enzima, se determinó el peso molecular a partir de la ecuación del coeficiente de retención (k_a). Los valores de elución y k_a , fueron obtenidos mediante la calibración de la columna de cromatografía de exclusión molecular con proteínas estándares del kit Bio Rad.

Se graficó el coeficiente de retención k_a vs el logaritmo del peso molecular de cada proteína estándar y se obtuvo la ecuación de la recta. Con el volumen de elución de la enzima problema, se calculó el coeficiente de retención (K_a), y se extrapoló en la ecuación de la recta para obtener el peso molecular de la enzima.

6.2.9. Determinación de glicosilaciones inulinasa de *F. incarnatum* CRT 197

Se utilizó el método de la tinción de shiff para determinar si la enzima presenta glicosilaciones, se corrió un gel de electroforesis SDS PAGE, utilizando 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de enzima pura y como control positivo a la peroxidasa de rábano.

El gel fue colocado en solución fijadora de metanol al 50% por una hora, se lavó el gel con agua Mili Q para retirar la solución fijadora. Después se añadió una solución de ácido peryódico al 1% durante 1 hora y se lavó con agua Mili Q. Posteriormente se añadió el reactivo de Shiff al gel. Una vez que se presentaron las bandas magentas, se añadió la solución de metabisulfito al 0.5% durante 2 horas. Se lavó el gel y se colocó en una solución de almacenamiento de ácido acético al 5%.

6.2.10. Determinación de la temperatura óptima de inulinasa de *F. incarnatum* CRT 197

Con la enzima pura se realizaron ensayos de actividad enzimática a diferentes temperaturas: 30, 40, 50, 60 y 70 °C, para ello se prepararon soluciones de inulina de agave al 1% en buffer de fosfatos 50 mM pH 5.

La enzima pura se liofilizó y se resuspendido en agua destilada, se tomaron 100 μ L de la enzima en un tubo eppendorf y se agregó 300 μ L de la solución de inulina de agave al 1% para comenzar la reacción enzimática. Se preparó un tubo control con 300 μ L de solución de inulina de agave y 100 μ L de agua destilada. Los tubos se incubaron a las distintas temperaturas (30, 40, 50, 60 y 70 °C) con agitación a 400 rpm por 30 minutos. Transcurrido ese tiempo se midió la hidrólisis enzimática por medio de la reacción de DNS.

6.2.11. Determinación del pH óptimo de la inulinasa de *F. incarnatum* CRT 197

Una vez determinada la temperatura óptima de la enzima pura, se realizaron ensayos de actividad enzimática variando el pH en intervalos de 0.5 cada uno a partir del pH 2.5 hasta llegar a pH 8, se preparó una solución de inulina de agave al 1% en buffer de fosfatos 50 mM pH 5.

Se tomaron 100 μ L de la enzima en un tubo eppendorf y se agregó 300 μ L de la solución de inulina de agave al 1% para comenzar la reacción enzimática. Se preparó un tubo control con 300 μ L de solución de inulina de agave y 100 μ L de agua destilada. Los tubos se incubaron 50 °C con agitación a 400 rpm por 30 minutos. Transcurrido ese tiempo se midió la hidrólisis enzimática por medio de la reacción de DNS.

6.2.12. Determinación de la actividad enzimática inulinasa variando el sustrato

La actividad enzimática de la enzima se determinó por el método DNS, variando el sustrato: inulina de agave, xilanos, levanos y sacarosa.

Se prepararon soluciones en buffer de fosfatos 50 mM y pH 5 con inulina de agave al 1%, levanos 1%, xilanos 1% y sacarosa al 0.5%.

Para comenzar las reacciones enzimáticas con los diferentes sustratos se agregaron 300 μ L de la solución de los diferentes sustratos en tubos de microcentrífuga y 100 μ L de la enzima a cada uno, los tubos control contenían 300 μ L de las soluciones con los sustratos y 100 μ L de agua destilada. Los tubos se incubaron a 50 °C con agitación a 400 rpm por 30 minutos. Transcurrido ese tiempo se midió la hidrólisis enzimática por medio de la reacción de DNS.

La concentración de azúcares reductores se obtuvo a partir de la curva patrón de fructosa para los sustratos inulina de agave, levanos y sacarosa. Y la curva patrón de xilosa para xilanos.

6.2.13. Cromatografía en capa fina (TLC)

Los productos de reacción se analizaron mediante TLC (Sílica gel 60 F254), se empleó como fase móvil butanol: etanol: agua: ácido acético en una proporción 3:2:0.7:0.3 (v/v) respectivamente. Se preparó una solución de inulina de agave al 1% para la actividad exo o endoinulinasa y para la actividad de transfructosilación se utilizó sacarosa a 1 y 10% a diferentes tiempos de reacción 2 y 24 hrs, utilizando la enzima pura.

Las reacciones se diluyeron 1:2. Posteriormente se prepararon soluciones patrón de sacarosa al 1%, fructosa 5%, glucosa al 5%, levano 5% y FOS 5% y se colocó 1 µL de cada solución patrón, así como de las reacciones en la cromatoplaça.

Se dejó correr la TLC 1 hora, se revelaron los productos de reacción con una solución de orcinol 10 mg/mL y ácido sulfúrico al 5% en etanol. Calentando la cromatoplaça hasta que aparecieran las manchas de reacción.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Resultados del análisis in silico

7.1.1. Identificación y caracterización molecular de la inulinasa de *F. incarnatum*

Recuperación de secuencias de proteínas de la familia glicosil hidrolasas

Para construir el árbol filogenético de la inulinasa de *F. incarnatum* se realizó una búsqueda de enzimas glicosil hidrolasas de la familia GH43, GH62, GH68 y GH32, de las cuales se eligieron dos de acuerdo al análisis de identificación de dominios conservados en la página NCBI. Con estas dos enzimas XP_031019455.1 y XP_031021624.1 se realizaron los alineamientos por medio de la herramienta

básica de búsqueda de alineación local (BLAST) que encuentra similitud local entre secuencias.

De este BLAST se recuperaron 72 enzimas similares con un porcentaje de similitud de 90% con las dos enzimas XP_031019455.1 y XP_031021624.1. Este alineamiento incluía enzimas hipotéticas que pertenecen a la familia de las glicosil hidrolasas y al género *Fusarium* entre las que destacan las especies de *F. oxysporum*, *flageliforme*, *graminearum*, *verticillioides*, *fujikuroi* y *culmorum*. Estas enzimas fueron utilizadas para realizar el alineamiento múltiple de secuencias y así construir el árbol filogenético de la enzima de *F. incarnatum*.

Alineamiento múltiple de secuencias recopiladas (AMS)

El AMS se realizó en MEGA-X utilizando el alineamiento ClustalW (Figura 15). En los alineamientos de las enzimas pertenecientes a FIESC28_ *Fusarium coffeatum*, podemos ver de los aminoácidos catalíticos están conservados. Por ejemplo, en las enzimas de la familia GH32 (β - fructofuranosidasas e inulinasas), están los tres motivos conservados característicos de esta familia "FMNDP", "RDP" y "EC", en los que se encuentran los aminoácidos de la triada catalica, dos ácidos aspárticos y un glutámico (Figura 15, cuadro azul).

En las enzimas de la familia GH43 y GH62 como las xilosidasas, arabinosidasas y α -n- arabinofuranosidasas también se encuentran estos tres aminoácidos catalíticos, sin embargo, los motivos ya no se conservan (Figura 15, cuadro verde).

7.1.2. Árbol filogenético la inulinasa de *F. incarnatum*

Para elaborar el árbol filogenético de la enzima hipotética de *F. coffeatum* (*F. incarnatum-equiseti*), se utilizó el método de Neighbour-joining y Máxima parsimonia. La historia evolutiva se infirió utilizando los mismos métodos.

Del árbol filogenético construido a partir de las enzimas XP_031019455.1 y XP_031021624.1 enfatizamos en dos análisis; el primero, se basa en el complejo *Fusarium incarnatum-equiseti* (*FIESC*) y su relación con la especie *F. coffeatum*.

Lima *et al*, a partir de análisis filogenéticos de TEF1 (Factor de elongación traslacional EF1 alfa) y secuencias del gen RPB2 (RNA polimerasa 2), identificaron los aislamientos como pertenecientes a dos especies filogenéticas (clado *incarnatum* y clado *equiseti*) del complejo de especies *Fusarium incarnatum-equiseti* (*FIESC*) (Lima *et al.*,2020).

En el árbol filogenético de Lima (Figura 16), dentro del clado de *incarnatum* podemos encontrar a *F. coffeatum*, si lo comparamos con el árbol filogenético construido a partir de las enzimas XP_031019455.1 y XP_031021624.1 comprobamos que *F. coffeatum* pertenece a este clado de *incarnatum*, puesto que se encuentra junto a la especie hermana *F. flageliforme* que pertenece al clado *equiseti* (Figura 17).

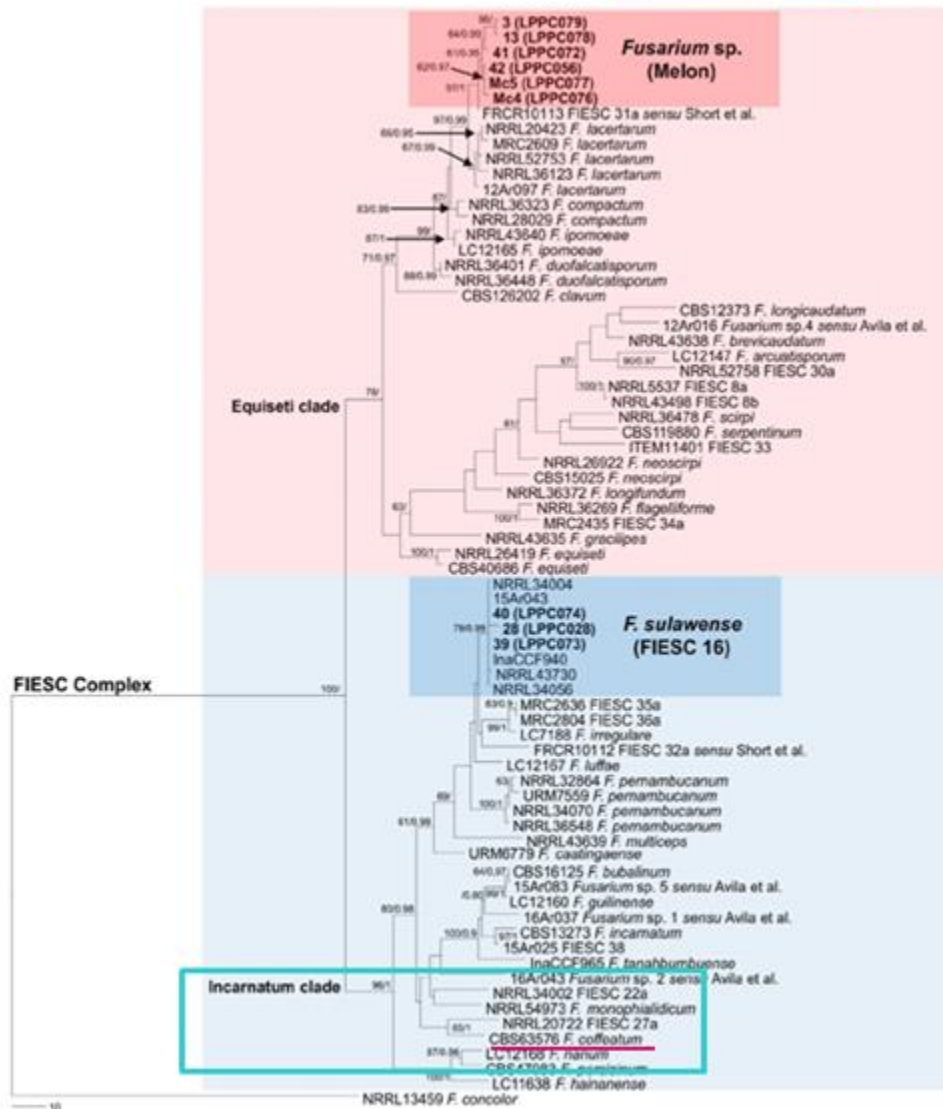


Figura 16. **Árbol filogenético del complejo FIESC a partir del factor TB1 en frutos del melón.** Derivado del clado *incarnatum* se observa a la especie *F. coffeatum*. Tomado de Lima et al., (2020)

El segundo análisis que destaca del árbol filogenético de la inulinasa de *F. incarnatum*, es la identificación de las enzimas glicosil hidrolasas, de las cuales posteriormente se realizará el análisis del modelo de la predicción de la estructura de la inulinasa.

El árbol filogenético está organizado por los ancestros hipotéticos (nodos), de los cuales parten 9 grupos con 10 taxones terminales (secuencias de enzimas pertenecientes a la familia de las glicosil hidrolasas). A estos grupos se les denomina clados (Figura 17) y se definen del interior al exterior del árbol a partir el nodo basal. Los clados basales o especies antiguas, están más cerca de la raíz, mientras que los clados derivados están más alejados porque son las especies más recientes.

Un clado es siempre un grupo monofilético, sin embargo, cuando diferentes taxones de la misma clase taxonómica se distribuyen en diferentes clados monofiléticos, el grupo de esa clase será un grupo parafilético (Resendiz, 2019)

Este grupo parafilético lo podemos observar en los 8 clados (Figura 17), por ejemplo, en la secuencia XP_031019455.1 (marcado en rosa) y XP_031021624.1 (marcado color violeta), pertenecen a clados hermanos monofiléticos, pero los clados derivados son grupos parafiléticos.

La enzima XP_031019455.1 corresponde a una glicosil hidrolasa de la familia GH32 donde se encuentran clasificadas las inulinasas, y la enzima XP_031021624.1 pertenece a la súper familia de las glicosil hidrolasas, muy cercana a la familia GH68 donde están las levansacarasas y a la GH62 donde están las arabinofuranosidasas.

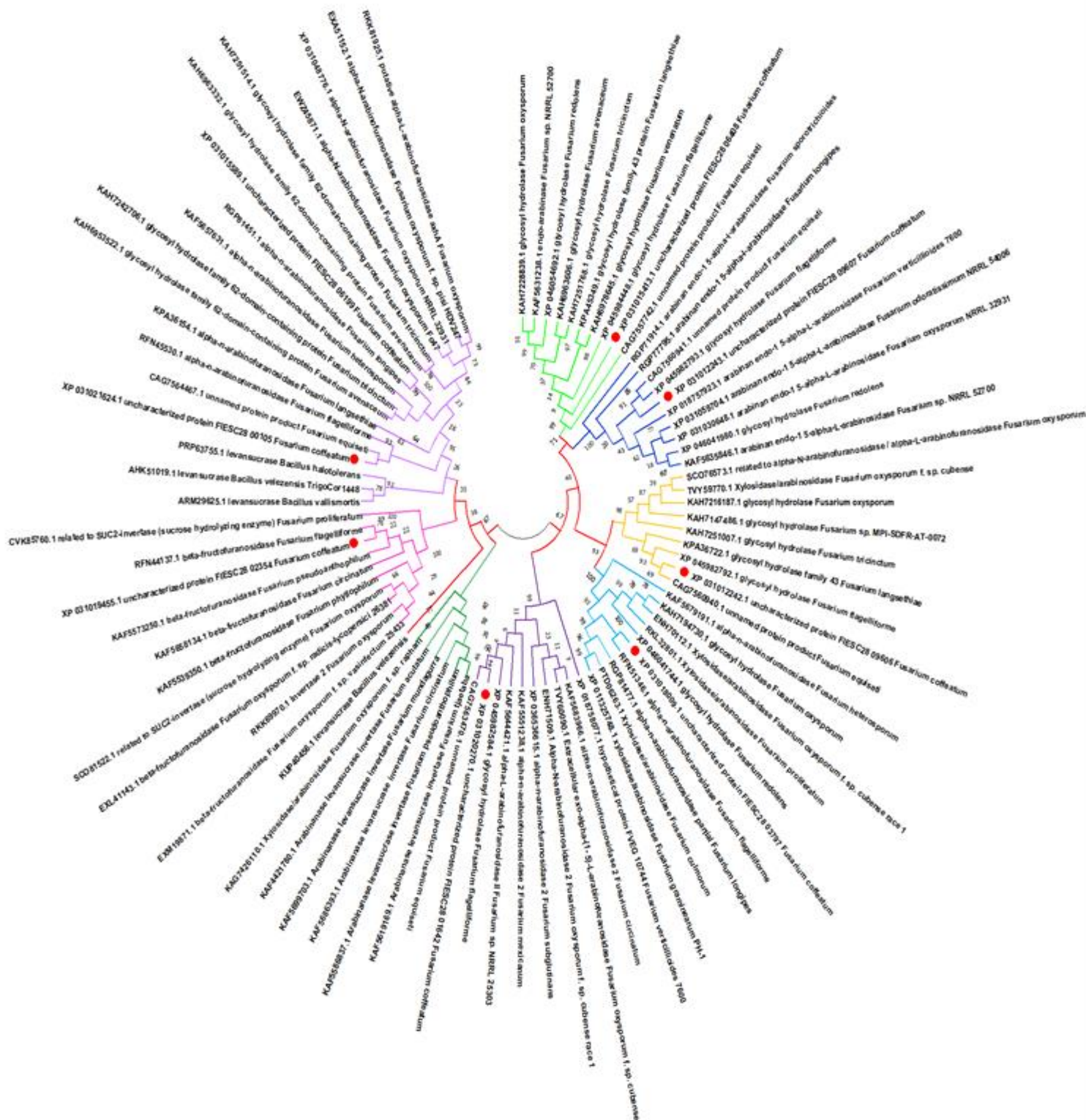


Figura 17. **Árbol filogenético de la inulinasa de *F. incarnatum***. Construido por el método Neighbour joining, Bootstrap a 500 réplicas. Las enzimas de la familia de las glicosil hidrolasas de *F. incarnatum* FIESC 28 [*Fusarium coffeatum*] están resaltados con rojo y los clados están marcados en colores.

Árbol filogenético condensado del clan J (GH32, GH68) y clan F (GH43 y GH62)

El siguiente árbol filogenético está construido solo con las enzimas de la familia de las glicosil hidrolasas del clan J GH32 y del clan F GH43 y GH62 (Figura 18), vemos a las especies del nodo interno organizadas dos grupos de especies formando 3 clados.

Por ejemplo, podemos observar dos grupos de taxones hermanos de la familia GH43, el primero en color naranja la enzima XP_031015413.1 (endo-arabinasa) y la XP_031012243 (arabin-endo- α 1,5). El segundo grupo (color amarillo) las enzimas XP_031018009.1 (alpha-n-arabinofuranosidasa) y la XP_031012242 (xilosidasa/arabinosidasa).

En el árbol también podemos ver en color verde, otro grupo de taxones hermanos la enzima XP_031019455.1 y XP_031021624.1.



Figura 18. **Árbol filogenético condensado de las enzimas glicosil hidrolasa de *F. incarnatum* FIESC28 [*Fusarium coffeatum*].**

7.1.3. Predicción de la estructura de la enzima de *F. incarnatum*

Para hacer la predicción de la estructura de la enzima, y de acuerdo con el análisis filogenético se utilizó la enzima XP_031019455.1 uncharacterized protein

FIESC28_02354 [*Fusarium coffeatum*], y la enzima XP_031021624.1 uncharacterized protein FIESC28_00105 [*Fusarium coffeatum*].

Modelo de la predicción de la estructura por homología

Los modelos de la predicción de la estructura de la enzimas XP_031019455.1 y XP_031021624.1, fueron construidos por homología en el servidor Swiss Model y en Phyre². Se seleccionaron los modelos de acuerdo al estadístico Qmean Z (Tabla 6) que nos proporcionan una puntuación que estima la calidad de un modelo de una proteína (Benkert *et al.*, 2011).

Tabla 6. Modelos de la estructura de la inulinasa de *F. incarnatum* construidos en Swiss Model

Secuencia	Modelos	Qmean
XP_031019455.1	Inulinase First crystal structure of an endo-inulinase, from <i>Aspergillus ficuum</i>	-4.7
	Exoinulinase INU1 <i>Kluyveromyces marxianus</i>	-3.55
	Structure of fructofuranosidase from <i>Schwanniomyces occidentalis</i>	-3.9
XP_031021624.1	Glycosyl hydrolase family protein from <i>Thielavia terretris</i>	-0.47
	Alpha- L-arabinofuranosidase <i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	-0.52
	Levansucrase of <i>Bacillus subtilis</i> levansucrase mutant	-5.25

Se eligió el modelo de la predicción de la estructura para la enzima XP_031019455.1 con Qmean de -3.55, construido a partir de la estructura cristalográfica de una exoinulinasa INU1. Las puntuaciones Z de alrededor de 0 reflejan una estructura "similar a la nativa", una puntuación Z "QMEAN" inferior a

-4,0 indica un modelo de baja calidad. Aunque el modelo tiene una Qmean de -3.55, se considera que no es un modelo bueno, pero que entra en los rangos de calidad.

En el caso de la enzima XP_031021624.1, se eligió el modelo construido a partir de la estructura cristalográfica de la glycosyl hydrolase family protein de *Thielavia terrestris*, con una Qmean de -0.47. En este caso el valor de Qmean es cercano a cero, lo que indica un modelo de buena calidad (Tabla 6).

Modelo de la predicción de la estructura de la enzima en AlphaFold2

A partir del script de Alphafold2 se construyó el modelo de la predicción de la estructura de la enzima XP_031019455.1 y la enzima XP_031021624.1.

AlphaFold produce una estimación de confianza por residuo en una escala de 0 a 100. Esta medida de confianza se llama pLDDT. En base a este índice se puede evaluar la precisión del modelo generado. Si tenemos regiones con pLDDT > 90 son modelos con alta precisión. Si las regiones se encuentran con pLDDT entre 70 y 90 son modelos buenos de predicción básica. Regiones con pLDDT entre 50 y 70 son de baja confianza Si observamos coordenadas 3D de regiones con pLDDT < 50, estas tienen una apariencia similar a una cinta, hablamos de modelos que no se deben interpretar.

Para la secuencia de aminoácidos XP_031019455.1, el gráfico de PLDDT por posición de aminoácidos, muestra que la mayoría de la estructura de la enzima tiene un PLDDT > 90 para todos los modelos generados (Figura 19a). El modelo 4 presenta PLDDT de 94, los demás modelos alrededor de 93. Se eligió el PDB de este modelo para minimizar su estructura y evaluar su calidad. En la figura 19b el gráfico de la cobertura de la secuencia de aminoácidos, representa la secuencia total de aminoácidos, la posición en la que se encuentran y la identidad de la secuencia de los homólogos en el alineamiento MMSQ, se esperaría que todos los aminoácidos se encontraran hacia las zonas coloreadas en verde y azul; sin embargo, aunque se encuentran en la zona anaranjada el modelo tiene calidad.

En el caso de la secuencia de aminoácidos de la enzima XP_031021624.1, el PLDDT es mayor a 90 (Figura 19c) para todos los modelos generados. En el gráfico

de la cobertura de la secuencia de aminoácidos, toda la secuencia de aminoácidos se encuentra dentro de la zona verde, indicando una mejor estimación de calidad del modelo (Figura 19d). De acuerdo a los resultados del modelado, tanto por homología como por AlphaFold2, se realizó la minimización de la estructura en Chimera 2.0 y la evaluación local y global de los modelos.

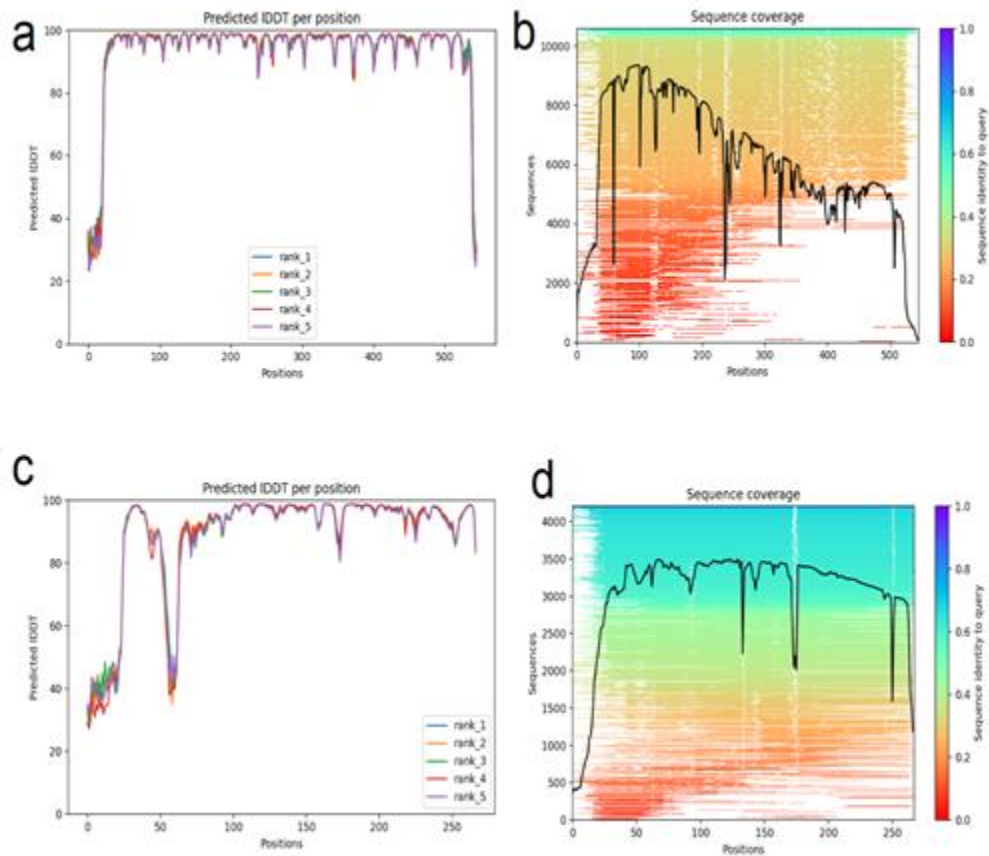


Figura 19. **Gráficos de PLDDT.** a). Estimación de confianza por residuo (pLDDT) de cada modelo generado en AlphaFold en una escala de 0 a 100 de la enzima XP_031019455.1. b). Cobertura de secuencia de todos los aminoácidos y la identidad de homología de la enzima XP_031019455.1. c). Estimación de confianza por residuo (pLDDT) de la enzima XP_031021624.1. d). Cobertura de secuencia de todos los aminoácidos y la identidad de homología de la enzima XP_031021624.1

Evaluación local y global de los modelos de la predicción de la estructura de la enzima

En Swiss Model en el apartado de Structure assessment se hizo la evaluación local y global de los modelos de la predicción de la estructura de la enzima obtenidos por homología y en AlphaFold, para elegir y validar el mejor modelo.

Gráfico de Ramachandran

El gráfico de Ramachandran es una forma de visualizar regiones energéticamente favorecidas para ángulos diedros frente a residuos de aminoácidos en la estructura de la proteína. En el gráfico de Ramachandran para el modelo obtenido por homología a partir de la secuencia de aminoácidos XP_031019455.1 (Figura 20a), la mayoría de los residuos de la enzima están dentro de las zonas favorecidas, estas regiones corresponden a las láminas β y hélices α . Así mismo, algunos residuos están en regiones menos favorecidas, como en la de los giros tipo II.

Sin embargo, existen residuos que aparecen en zonas no favorecidas del Ramachandran, probablemente el modelo de la predicción de la estructura de la enzima presenta residuos en posiciones forzadas.

En el modelo obtenido por AlphaFold también podemos ver que en las zonas favorables del gráfico de Ramachandran (Figura 20b) se encuentran la mayoría de los residuos, con excepción de algunas cadenas de aminoácidos que están en la zona desfavorecida, estos son los extremos tanto iniciales como finales de la secuencia de aminoácidos, normalmente estas cadenas son difíciles de predecir.

En el caso de la enzima XP_031021624., los gráficos de Ramachandran para todos los modelos (Figura 20c y 20d) se puede observar que la mayoría de los residuos de la enzima caen dentro de las zonas favorecidas.

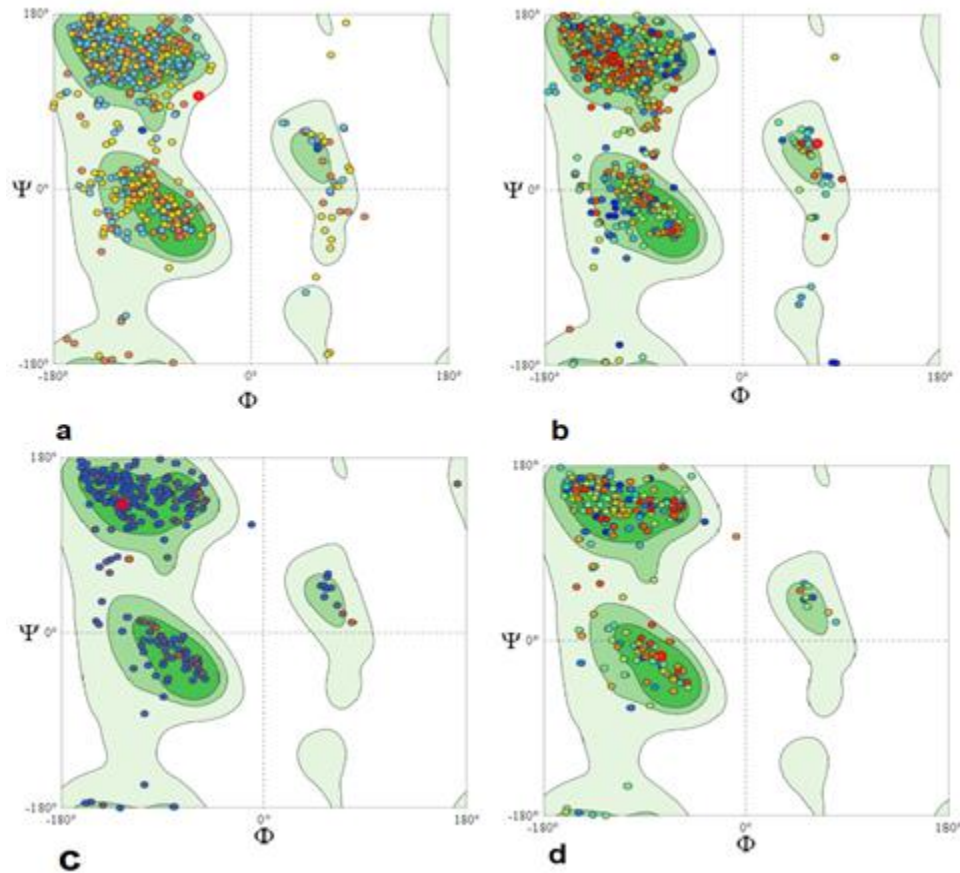


Figura 20. **Gráfico de Ramachandran.** a). Ramachandran del modelo de la estructura de la enzima XP_031019455.1 obtenido por homología. b) Ramachandran de la enzima XP_031019455.1 del modelo construido en AlphaFold. c) Ramachandran del modelo de la estructura de la enzima XP_031021624.1. obtenido por homología. d) Ramachandran de la enzima XP_031021624. del modelo construido en AlphaFold.

Estimación de calidad de los modelos

Para el modelo de la enzima XP_031019455.1 construido por homología, la QMEAN es de -3.55 (Figura 21a), se encuentra dentro del parámetro de puntuaciones mayores a -4.0 indicando que los modelos son de calidad. En el modelo AlphaFold el valor de QMEAN es de -0.8 (Figura 21b), cercano a las zonas azules del estadístico, indicando la mejor calidad en la predicción de la estructura.

En la enzima XP_031021624.1, los valores de Qmean, para los modelos son óptimos pues se encuentran cercanos a 0, con puntuaciones de -0.47 para el modelo por homología (Figura 21c) y -0,37 para el modelo AlphaFold (Figura 21d).

Las puntuaciones Z de QMEAN alrededor de cero indican una buena concordancia entre la estructura del modelo y las estructuras experimentales de tamaño similar.

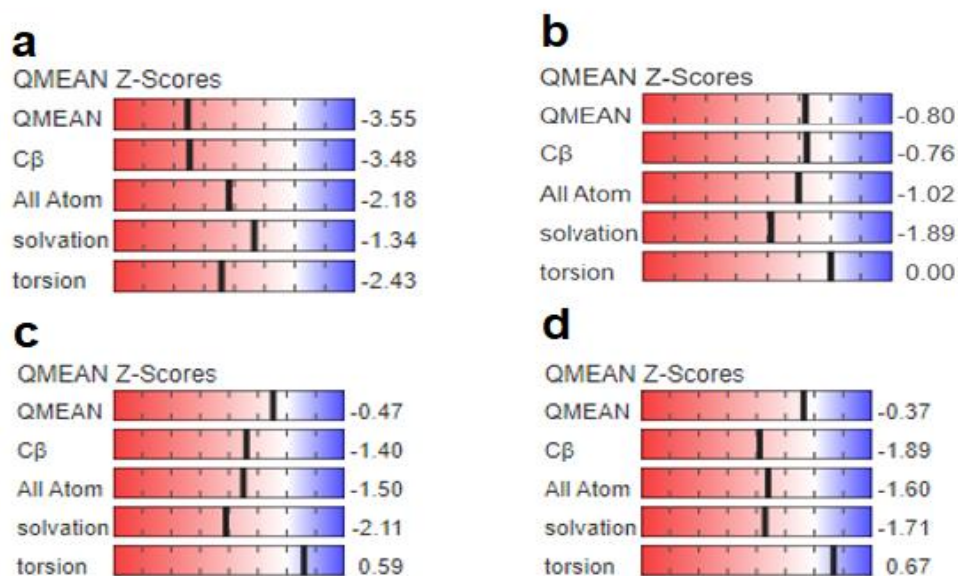


Figura 21. **Qmean de los modelos de la predicción de la estructura de la inulinasa de *F. incarnatum* CRT 197.** a) Estimación de calidad Z-Qmean de la enzima XP_031019455.1 del modelo generado a partir del pdb de la estructura cristalográfica de la exoinulinasa de *Kluyveromyces marxianus*. b). Estimación de calidad Z-Qmean de la enzima XP_031019455.1 del modelo AlphaFold. c). Estimación de calidad Z-Qmean de la enzima XP_031021624.1 a partir del pdb de la estructura cristalográfica la glicosil hidrolasa de *Thielavia terretris*. d). Estimación de calidad Z-Qmean de la enzima XP_031021624.1 del modelo AlphaFold.

Validación de estructuras MolProbity

De acuerdo al gráfico de Ramachandran y al estadístico Qmean, se eligieron los modelos AlphaFold, para realizar la validación de la estructura a través de MolProbity, que es un servicio web de validación de estructuras que proporciona una evaluación de la calidad del modelo tanto a nivel global como local para proteínas y ácidos nucleicos.

La evaluación de la estructura espera mostrar las puntuaciones más relevantes, como Score MolProbity (intervalo lo más bajo posible +/-1), Clash score (cero), Ramachandran Favoured (< 0.2%), Ramachandran Outliers (< 1%), Bad bonds y Bad angles (cero) (Tabla 7).

Tabla 7. Evaluación local y global del modelo de la predicción de la estructura de la enzima

Enzima	ANÁLISIS					
	Score MolProbity	Clash Score	Ramachandran Favoured	Ramachandran Outliers	Bad Bonds	Bad angles
XP_031019455.1	1.35	1	95.6%	1.4%	0	21
XP_031021624.1	1.11	0	97%	0	0	6

Para el modelo de la predicción de la estructura de la enzima XP_031019455.1 el score fue de 1.35. El Score MolProbity proporciona el puntaje de calidad de la proteína combinada que refleja la resolución cristalográfica a la que se esperaría tal calidad y esta debe ser tan baja como sea posible. Clash score muestra los choques sin enlaces H > 0.45 Å, el modelo Alpha fold presentó sólo un contacto (Tabla 7). El número de choques debe ser cero, por lo que la estructura al menos uno de los átomos está modelado incorrectamente.

Otro parámetro de validación de la estructura de la proteína son las zonas favorecidas a partir del gráfico de Ramachandran, se espera que para un caso ideal sean mayores al <0.2%, el modelo presento 95.6%, indicando que las estructuras se encuentran en las regiones energéticamente favorecidas para los ángulos diedros frente a los residuos de aminoácidos en la estructura de la proteína. En las zonas no favorecidas del Ramachandran, el parámetro ideal es tener menos del <1% de estructuras en estas zonas desfavorecidas. El modelo Alpha fold presenta menor porcentaje de estos valores (1.4%).

En el caso de bad angles el modelo tiene 21. Los malos ángulos de enlace son a menudo causados por cadenas laterales o péptidos girados de manera incorrecta, especialmente si también hay choques estéricos o valores atípicos conformacionales en el mismo residuo (Randy *et al.*, 2013).

Para la enzima XP_031021624.1, los valores de MolProbity, son buenos, debido a que presente el 97% de las estructuras en las zonas energéticamente favorecidas, cero contactos y enlaces malos.

Modelo Final de la predicción de estructura de la inulinasa de la enzima de *F. incarnatum* de la secuencia de aminoácidos XP_031019455.1 y XP_031021624.

En el NCBI se utilizó la función de búsqueda de dominios conservados (CD- Search) para identificar estos dominios conservados en esta secuencia de proteína en comparación con las secuencias de proteínas de otros modelos realizando un alineamiento. Los resultados mostraron que la secuencia de la enzima contiene los motivos conservados FMNDP, RDP y EC pertenecientes a la familia de las GH32. En el alineamiento (Figura 22) se observan los 3 aminoácidos catalíticos, los dos aspárticos y el glutámico.

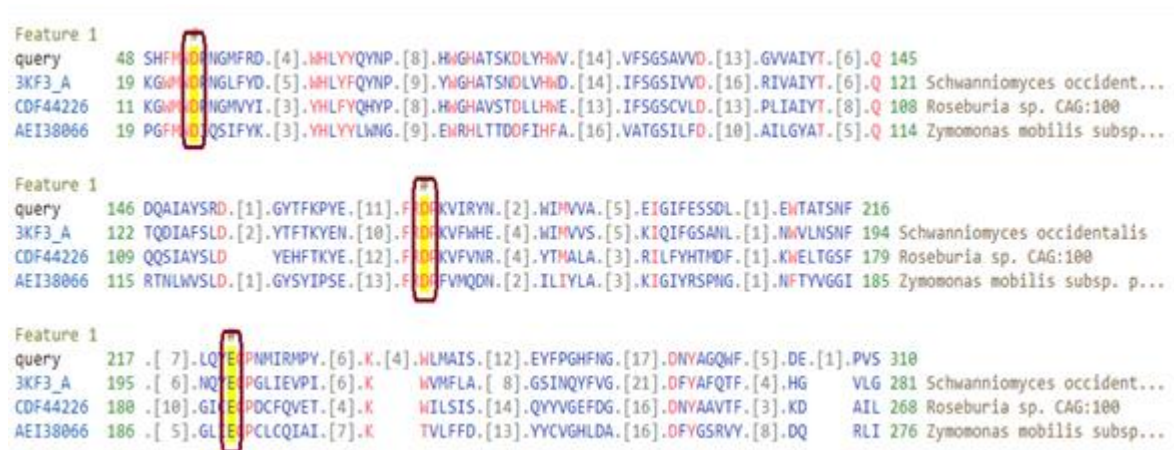


Figura 22. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la enzima XP_031019455.1 uncharacterized protein FIESC28_02354 [*Fusarium coffeatum*]. En amarillo están señalados los tres aminoácidos conservados pertenecientes al sitio activo de las enzimas de la familia de las GH32.

En PyMOL se visualizó el modelo de la predicción de la estructura de la enzima XP_031019455.1, en la cual se observan los dominios β propela y β sándwich. Además, se identificó la triada catalítica de la enzima, los tres residuos conservados, dos aspárticos y el glutámico. Estos tres residuos se localizan en tres motivos conservados “FMNDPNG”, “EC” y “RDP” (Figura 23).

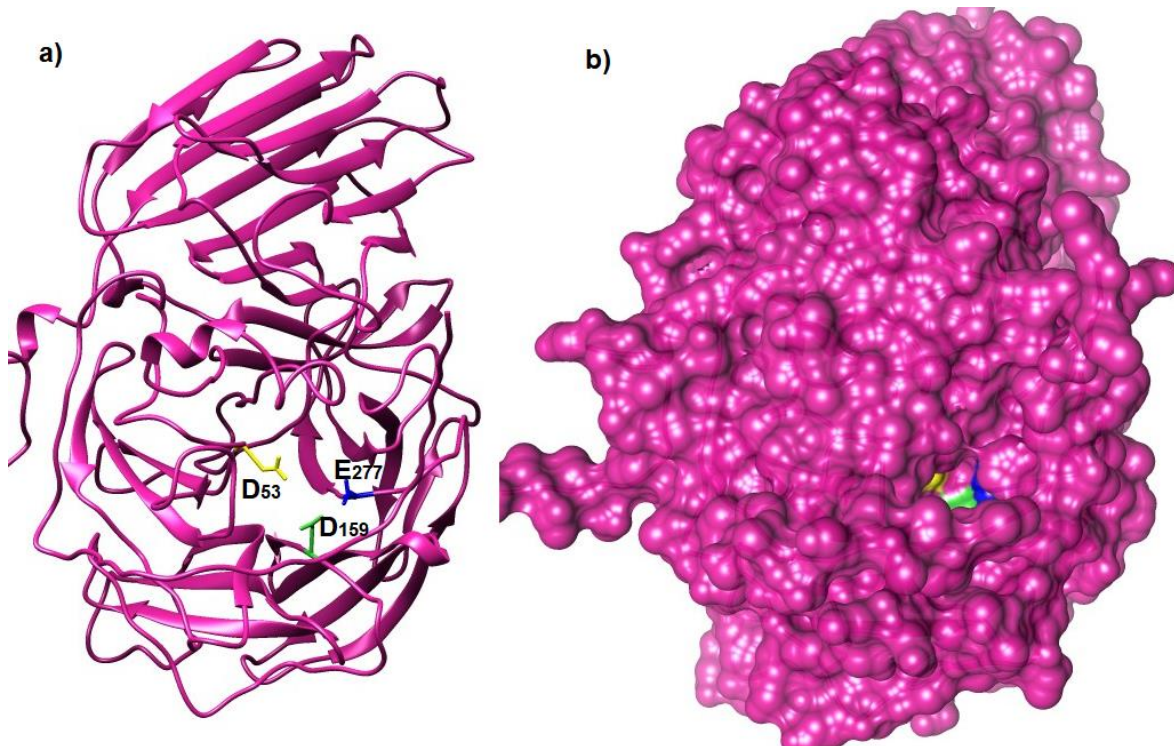


Figura 23. **Modelo final de la predicción de la estructura de la enzima XP_031019455.1.** a) Representación en caricatura de la estructura de la enzima, se muestra el dominio beta propela y beta sándwich. Los residuos de la triada catalítica, en varillas de color amarillo y verde los ácidos aspárticos y en color azul el ácido glutámico. b) Representación en superficie de la enzima, se observa el sitio activo en forma de embudo y los aminoácidos catalíticos en el centro.

Para la enzima XP_031021624.1 uncharacterized protein FIESC28_00105 [*Fusarium coffeatum*], los resultados mostraron que la enzima contiene tres aminoácidos catalíticos, dos aspárticos y un glutámico, de la familia de las glicosil hidrolasas GH32, GH43, GH62 y GH68 (Figura 24).

```

Feature 1
query      28 LPTTYKHKSSGPLAQPK.[5].LKDFTVAPYNGQQLVYAT.[5].NKSVMGFSP.[2].DLSQLGSA.[ 9].VAPTLFYF 107
4N2Z_A     22 LPTTQHTSTGPLVGPK.[8].IKDFTIILINGTHHVFAS.[6].YNLVYFTF.[1].DNADAPNA.[15].AAPQVWF 110 Podospora anserina
4PVI_A     20 QGSSMKMSTGSLVFPK.[8].IKDFTAVLINGTYHVFAS.[6].YIMVYFNF.[1].DFAEANNA.[15].AAPQVYF 108 Scytalidium thermophilum
CAN94755   229 LPTTFRMQSSALVSPK.[9].IKDFTVSFFNDRMHIYAT.[7].WQMTYLNF.[1].DMSQAASA.[15].CAPQMFFF 319 Sorangium cellulosum

Feature 1
query      108 KPKGIWILAHQ.[3].HKFSYRT.[6].VNGHSQ.[16].IDTVIGD.[2].NMVLFAGD.[1].GKIYRSSMPIGNF 189
4N2Z_A     111 APFKLWLVVYQ.[1].GNAAYST.[6].PKGHTA.[22].YDMWVCD.[2].SCHLFSSDD.[1].GQLYRSETSLEQF 196 Podospora anserina
4PVI_A     109 EPHKLWLVVYQ.[1].GNAAYST.[6].PSKHTA.[22].YDMWVCD.[8].LCHLFSSDD.[1].GHLYRSQTTLAQF 200 Scytalidium thermophilum
CAN94755   320 RPQNKWYLIYQ.[1].QPQFST.[6].PDTWTR.[16].IDWVWVCD.[2].NCYLFFFTGD.[1].GRMYRSQTTLQNF 399 Sorangium cellulosum

Feature 1
query      190 P.[2].FGA.[1].SQ.[ 8].NLFEAVQVYSI.[4].KYLHIVEA.[7].RYFRSFTANSL.[3].WTPNA.[1].TEN 259
4N2Z_A     197 P.[2].MSQ PV.[ 8].DLFEAACVYSL.[3].KYLLEVEA.[6].RMFRSWTADSI.[3].WQGLA.[1].TEQ 263 Podospora anserina
4PVI_A     201 P.[2].MSE PE.[10].ALFEAACVYRI.[7].KYLLEVEA.[6].RYFRSWTSORI.[3].WIPLA.[1].TEA 273 Scytalidium thermophilum
CAN94755   400 P.[2].FGP VS.[ 9].NLFEASSTYKI.[4].KYLTLIEA.[6].RFYRSFTADRL.[3].WTPLA.[1].TWN 468 Sorangium cellulosum

```

Figura 24. Alineamientos de la secuencia de aminoácidos de la enzima XP_031019455.1 uncharacterized protein FIESC28_02354 [*Fusarium coffeatum*]. En amarillo están señalados los tres residuos ácidos conservados pertenecientes al sitio activo de enzimas de la familia glicosil hidrolasas.

En la figura 25 se muestra el modelo final de la predicción de la estructura de la enzima XP_031021624. 1, en la cual se observa únicamente el dominio beta propela y unas secuencias “LKDF”, “IDVTQ”, “LFEA”, donde se encuentran los dos aspárticos y el glutámico pertenecientes a la triada catalítica (Figura 25).

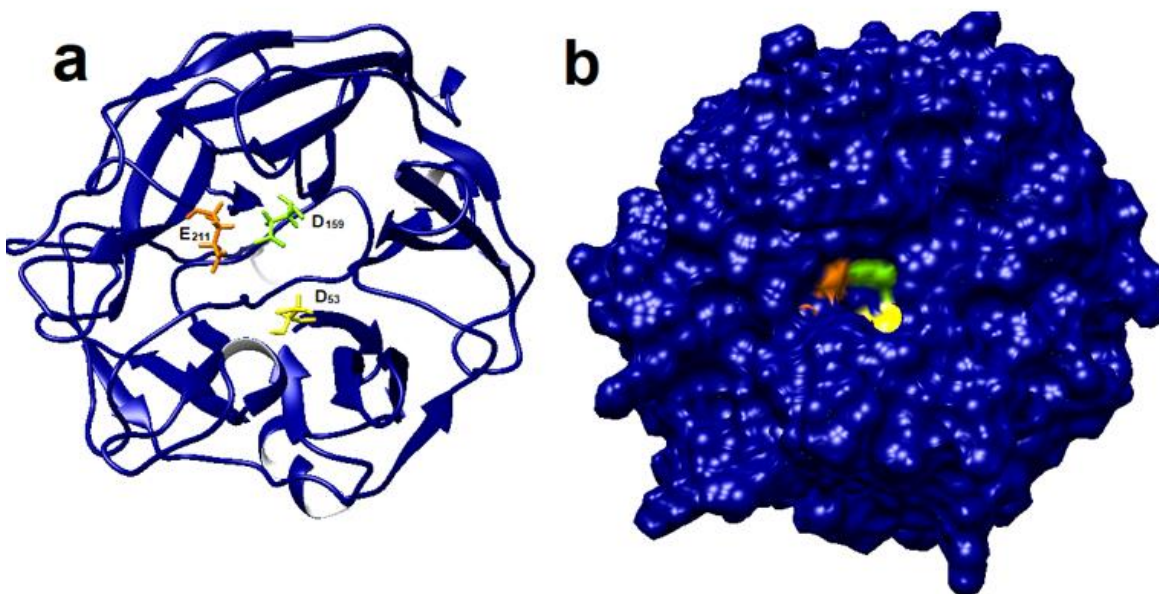


Figura 25. Modelo final de la predicción de la estructura de la enzima XP_031021624.1. a) Representación en caricatura del modelo de la estructura de la enzima, se muestra el dominio β propela con los aminoácidos catalíticos en varillas de color amarillo y verde (ácidos aspárticos), en color naranja el ácido glutámico. b) Representación en superficie de la enzima en donde se observa el sitio activo en forma de embudo y los aminoácidos catalíticos en el centro.

Superposición de las estructuras de los modelos elegidos

Con los modelos elegidos se realizó la minimización de la estructura de las enzimas XP_031019455.1 y XP_031021624.1, debido a que ambas secuencias de aminoácidos, contienen los aminoácidos en el sitio catalítico para tener actividad inulinasa. Se realizó la superposición de los modelos de la predicción de las estructuras, con la finalidad de ver las diferencias u homología entre ellas.

La estructura de la enzima XP_031019455.1 tiene los dos dominios β sándwich y la β propela (azul) consistente con una glicosil hidrolasa GH32. La estructura de la enzima XP_031021624.1 solo presenta el dominio β propela de 5 palas (verde) con características de las glicosil hidrolasas. En ambas estructuras vemos que existen algunas cadenas faltantes, se puede identificar las diferencias entre los modelos, destacando estas variaciones en la cadena inicial de aminoácidos y al final de la secuencia (Figura 26).

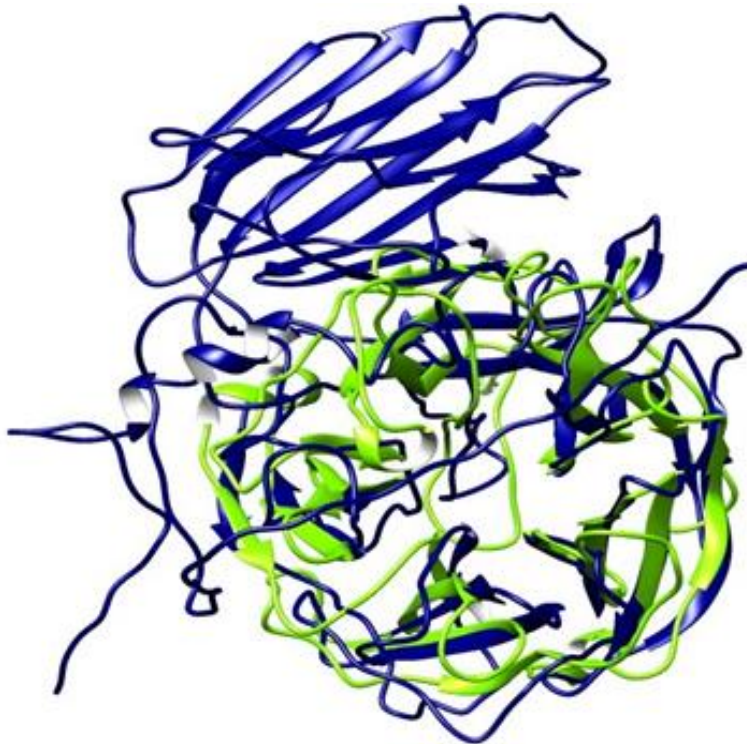


Figura 26. **Superposición de los modelos de la predicción de la estructura de las de las enzimas.** En color azul la estructura de la enzima XP_031019455.1 y en color verde la estructura de la enzima XP_031021624.1.

Comparación de la triada catalítica de los modelos de la predicción de la estructura de la inulinasa de *F. incarnatum*

La enzima XP_031019455.1 (azul rey) correspondiente a una inulinasa GH32 y XP_031021624.1 (azul cian) que es una enzima glicosil hidrolasa (Figura 27). Al comparar las estructuras, en el dominio beta propela, ambas secuencias tienen en el sitio activo los aminoácidos catalíticos, dos aspárticos y un glutámico en la misma posición.

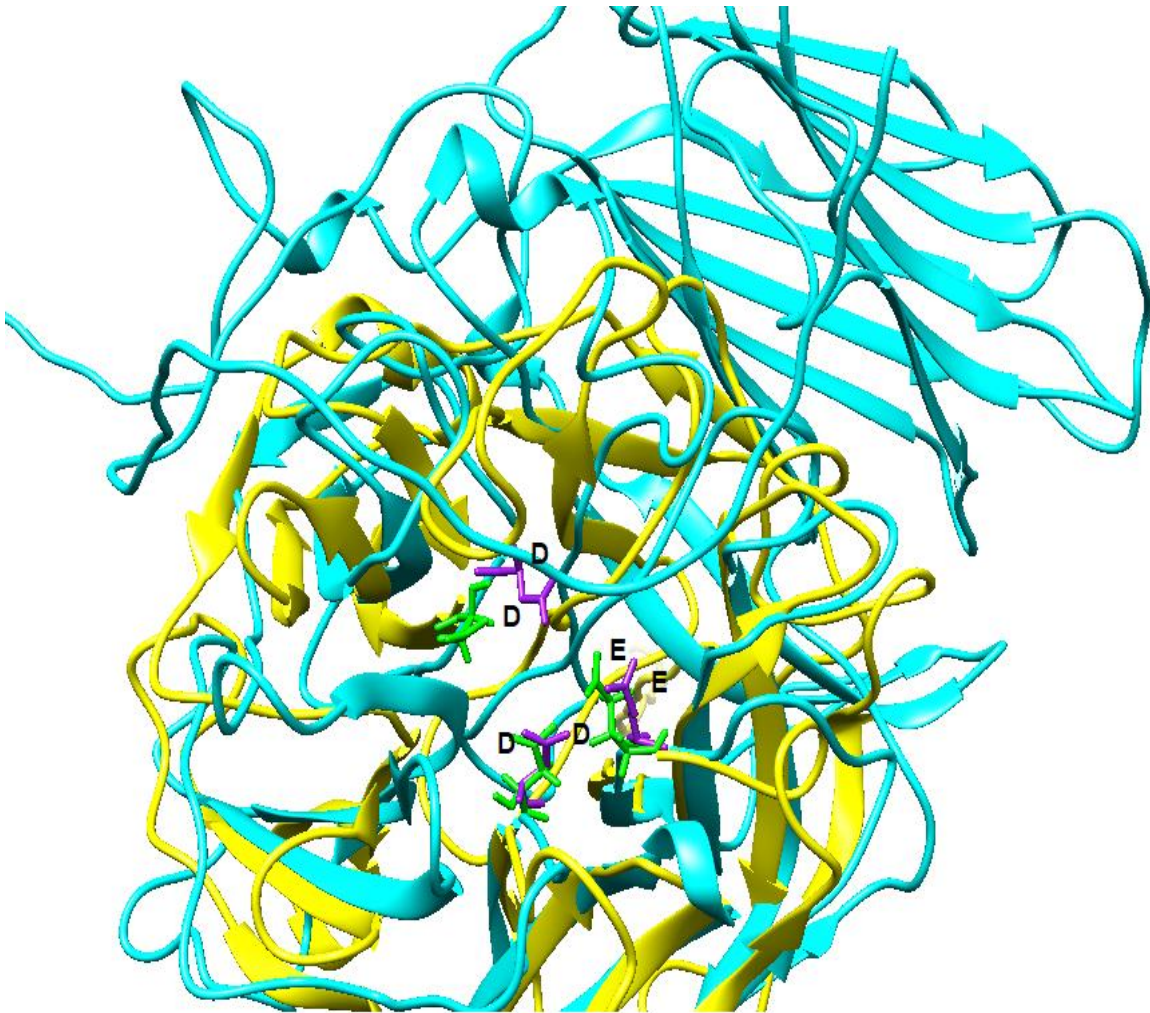


Figura 27. **Superposición de los modelos de la predicción de la estructura en el sitio activo.** En azul cian la enzima XP_031019455.1 y los aminoácidos catalíticos en color morado. En amarillo el modelo de la enzima XP_031021624.1 y los aminoácidos catalíticos en color verde.

7.2. Resultados del análisis experimental

7.2.1 Determinación de la actividad enzimática inulinasa *F. incarnatum* CRT 197 variando la fuente de carbono.

Una vez obtenidos los modelos de las posibles enzimas con actividad inulinolítica que pudiera estar produciendo *F. Incarnatum*, el siguiente paso fue caracterizar experimentalmente a la o las posibles inulinasas variando la fuente de carbono utilizando 1% de inulina de achicoria, 1% de inulina de agave y 1% de sacarosa y como fuente de nitrógeno nitrato de potasio.

En la figura 28, se puede observar que con inulina de achicoria al 1% la actividad inulinasa se presenta hasta las 96 h y la actividad enzimática al finalizar el tiempo de incubación es de 0.004 U/mL. Utilizado como fuente de carbono la inulina de agave al 1%, la actividad enzimática inulinasa es de 0.0299 U/mL a las 96 horas y al final del tiempo de incubación 190 h con 0.022 U/mL, alrededor de 20% más de actividad enzimática, comparado con la inulina de achicoria.

No obstante, en los medios con sacarosa no estuvo presente la actividad enzimática. En un estudio realizado por Verhaest *et al.*,2006, analizaron la arquitectura del sitio activo de la fructano 1-exohidrolasa de achicoria, utilizando el FOS 1-kestosa como sustrato y sacarosa como inhibidor. Encontraron que la sacarosa actúa como inhibidor debido a que el oxígeno de la glucosa forma un enlace de hidrógeno con el catalizador ácido-base E201, inhibiendo la reacción (Verhaest *et al.*,2006).

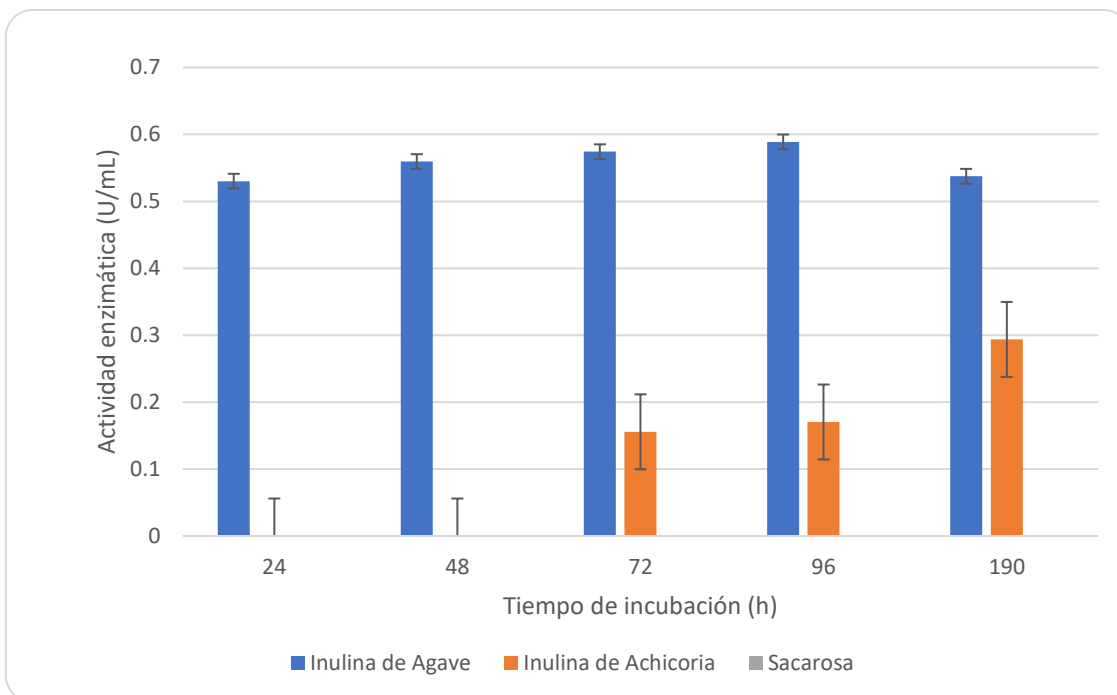


Figura 28. **Actividad enzimática inulinasa del sobrenadante de *F. incarnatum* CRT 197.** Cada medio de cultivo líquido contiene distintas fuentes de carbono: inulina de agave al 1%, inulina de achicoria al 1% y sacarosa al 1%, con nitrato de potasio como fuente de nitrógeno, incubados durante 190 h a 30°C y 400 rpm.

7.2.3. Determinación de la actividad enzimática inulinasa *F. incarnatum* CRT 197 variando la fuente de nitrógeno.

Para conocer la fuente de nitrógeno con la que se obtiene mayor actividad inulinasa producida por la cepa *F. incarnatum* CRT197. A los cultivos en medio líquido con inulina de agave al 1% y variando la fuente de nitrógeno: extracto de levadura, extracto de carne, peptona, nitrato de sodio, nitrato de potasio y sulfato de amonio se les evaluó la actividad enzimática inulinasa.

En la figura 29 se muestran las variaciones en la actividad enzimática presentada en todos los medios de cultivo con inulina de agave al 1% y variando la fuente de nitrógeno. Con nitrato de potasio a las 120 h la actividad enzimática inulinasa fue de 0.64 U/mL y conforme avanzó el tiempo de incubación la actividad enzimática se mantuvo.

Mientras que con nitrato de sodio y peptona la actividad enzimática fue menor durante todo el tiempo de incubación, de 0.28 U/mL y 0.32 U/mL respectivamente. También con peptona a las 190 h la actividad enzimática llegó a su máximo de 0.65 U/mL.

Después de las 190 horas de incubación de *F. incarnatum* CRT 197 se observó que las mejores fuentes de nitrógeno fueron el extracto de levadura y el sulfato de amonio con 0.84 U/mL y 0.80 U/mL respectivamente (Figura 29).

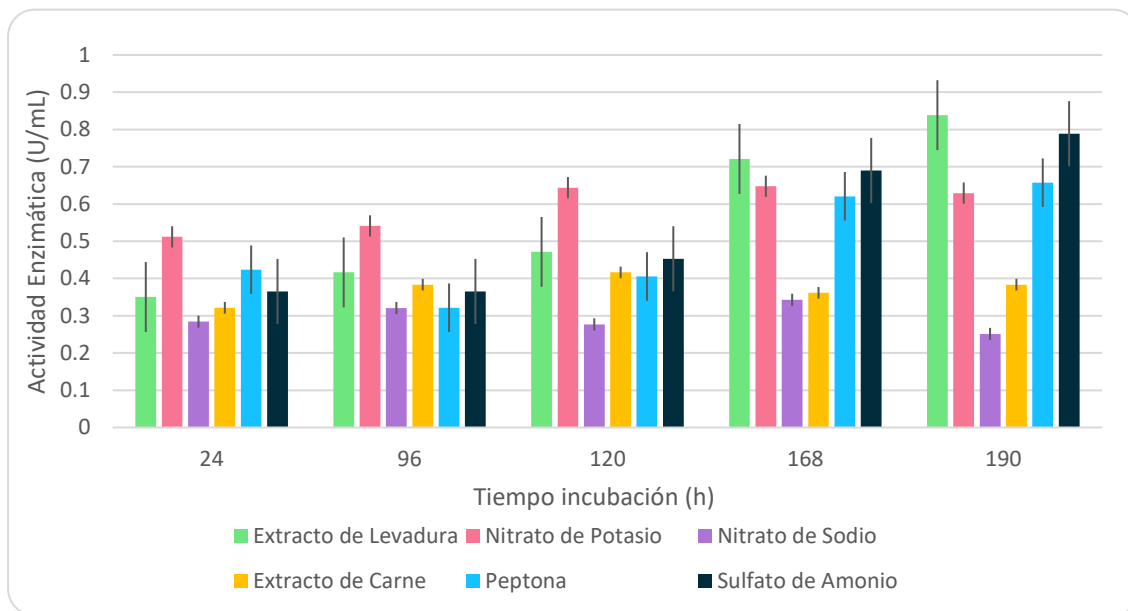


Figura 29. **Actividad enzimática inulinasa de *F. incarnatum* CRT 197.** Los medios de cultivo líquido contienen inulina de agave al 1%, con distintas fuentes de nitrógeno: extracto de levadura, extracto de carne, nitrato de potasio, nitrato de sodio, peptona y sulfato de amonio, incubados durante 190 h a 30°C y 400 rpm.

Neera, *et al.*, reportaron la hidrólisis de inulina catalizada por una inulinasa producida por una cepa de *Fusarium sp.* aislada de la rizosfera de Dahlia. La mayor concentración de enzima se obtuvo al 0.2 % (p/v) de extracto de levadura como fuente de nitrógeno comparada con la peptona. El extracto de levadura es una fuente de nitrógeno, cuya composición contiene aminoácidos, vitaminas y elementos que tienen un mayor aporte de nitrógeno (Hakobyan *et al.*, 2012), por lo tanto, se beneficia el crecimiento de los microorganismos, al producir mayor cantidad de enzimas que puedan hidrolizar los fructanos.

7.3. Purificación de la inulinasa de *F. incarnatum* CRT 197

7.3.1. Purificación de la inulinasa por cromatografía de exclusión molecular

Una vez determinadas que la inulina de agave al 1% como única fuente de carbono y el extracto de levadura como fuente de nitrógeno, son las mejores condiciones de producción de la inulinasa, el siguiente paso fue purificar a la inulinasa de *F. incarnatum*, utilizando una cromatografía de exclusión molecular. Se realizaron dos métodos de concentración de proteínas, para obtener la mayor cantidad de enzima. El primer método de concentración de proteínas fue precipitando la enzima con acetona fría y el segundo liofilizando el sobrenadante.

La purificación se llevó a cabo en un equipo FPLC acoplado a una columna superdex 200 con un flujo de 0.5 mL/min de buffer de fosfatos 50mM pH 6, conteniendo NaCl 500 mM. Con ambos métodos de concentración de la enzima se logró obtener un cromatograma en el que la enzima eluyó de la misma manera.

Purificación por cromatografía de exclusión molecular precipitando la enzima con acetona

El primer paso de la purificación fue la precipitación del sobrenadante, donde creció *F. incarnatum* CRT197, con acetona fría durante 24 horas a -20°C. El pellet se resuspendió en buffer de fosfatos 50 mM pH 6, se separó a través del FPLC, donde se recuperaron las fracciones denominadas F8, F9, F21, F22 y F23 que mostraron señal a 280 nm. En la figura 30, se muestra el cromatograma de exclusión molecular.

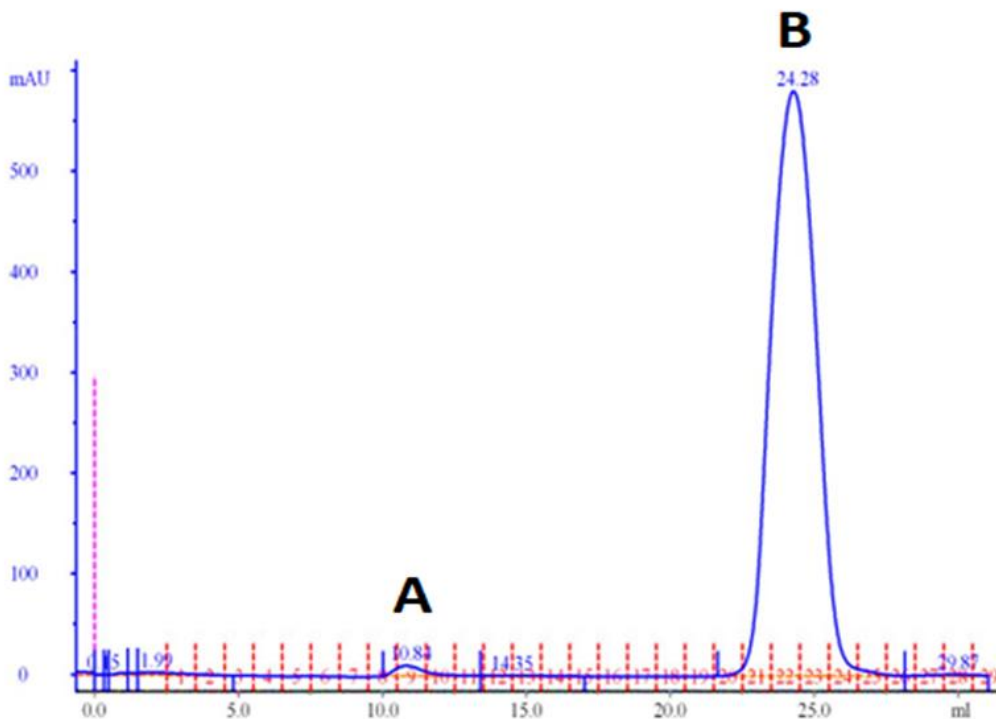


Figura 30. **Cromatograma de exclusión molecular de la inulinasa de *F. incarnatum* CRT 197 (concentración de proteínas por precipitación con acetona).** Se utilizó una columna superdex 200, con buffer de fosfatos 50 mM pH 6 conteniendo NaCl 500 mM y flujo de 0.5 mL/min. Se observan dos picos que corresponde a la cantidad de proteína expresada en unidades de absorbancia. El pico A corresponde a la fracción 8 y 9 con un volumen de elución de 10.84 mL. El pico B a las fracciones 21,22 y 23, y un volumen de elución de 24.28 mL.

Se pueden observar 2 picos que corresponden a la cantidad de proteína en mili unidades de absorbancia (mAU), el pico A con un área de 12.89 mAU*mL y una absorbancia de 10.5 mAU y pico B con área de 1041 mAU*mL y absorbancia de 581.4 mAU, además de eluir a los 24.8 mL (Figura 30).

A cada fracción obtenida se le determinó cantidad de proteína y actividad enzimática por el método DNS. La fracción 8 y 9 (pico A) no presentaron actividad enzimática, y las fracciones F21, F22 y F23 (pico B) si tuvieron actividad inulinasa de 13.95, 6.67, 6.63 U/mg prot respectivamente.

Terminado el proceso de purificación y realizadas las determinaciones enzimáticas y cantidad de proteína a las fracciones obtenidas, se construyó la tabla de purificación (Tabla 8) para obtener el rendimiento y las veces de purificación durante todo el proceso, así como la actividad enzimática específica.

Se comenzó con un volumen de 80 mL de sobrenadante obtenido del medio de cultivo con inulina de agave al 1% y extracto de levadura como fuente de nitrógeno donde creció *F. incarnatum* CRT197, una vez precipitada la proteína se obtuvieron 8 mL de precipitado con 0.75 mg de proteína total, posteriormente con la purificación por cromatografía de exclusión molecular se obtuvieron 3 mL de enzima con 0.093 mg de proteína total., las veces de purificación fueron 2 y el rendimiento de 1.1 %, esto es muy bajo debido a la pérdida de proteína durante el proceso, específicamente durante la precipitación del sobrenadante con acetona.

Tabla 8. Tabla de la purificación (precipitando la enzima) de la inulinasa de *F. incarnatum*

	V	P	PT	AE	AT	AEe	VP	% R
Paso de purificación	(mL)	(mg/mL)	(mg)	(U/mL)	(U)	(U/mg)		
Sobrenadante	80	0.16	13	2.255	180	13.81	1	100
Precipitado	8	0.09	0.75	1.421	11	15.24	1.1	6
Exclusión Molecular	3	0.03	0.093	0.678	2	22.6	2	1.1

Purificación por cromatografía de exclusión molecular del sobrenadante liofilizado de F. incarnatum CRT 197

Debido a que la cantidad de proteína, el rendimiento y las veces de purificación fue muy bajo, durante la purificación por cromatografía de exclusión molecular precipitando con acetona el sobrenadante de *F. incarnatum*, se decidió liofilizar el sobrenadante en lugar de precipitarlo, y así poder obtener mayor concentración de

enzima y mejorar la purificación, además de mejorar el rendimiento y las veces de purificación de la enzima.

Se realizó de la misma manera la separación de la enzima por cromatografía de exclusión molecular, donde se obtuvo un cromatograma similar al de la primera separación (Figura 31).

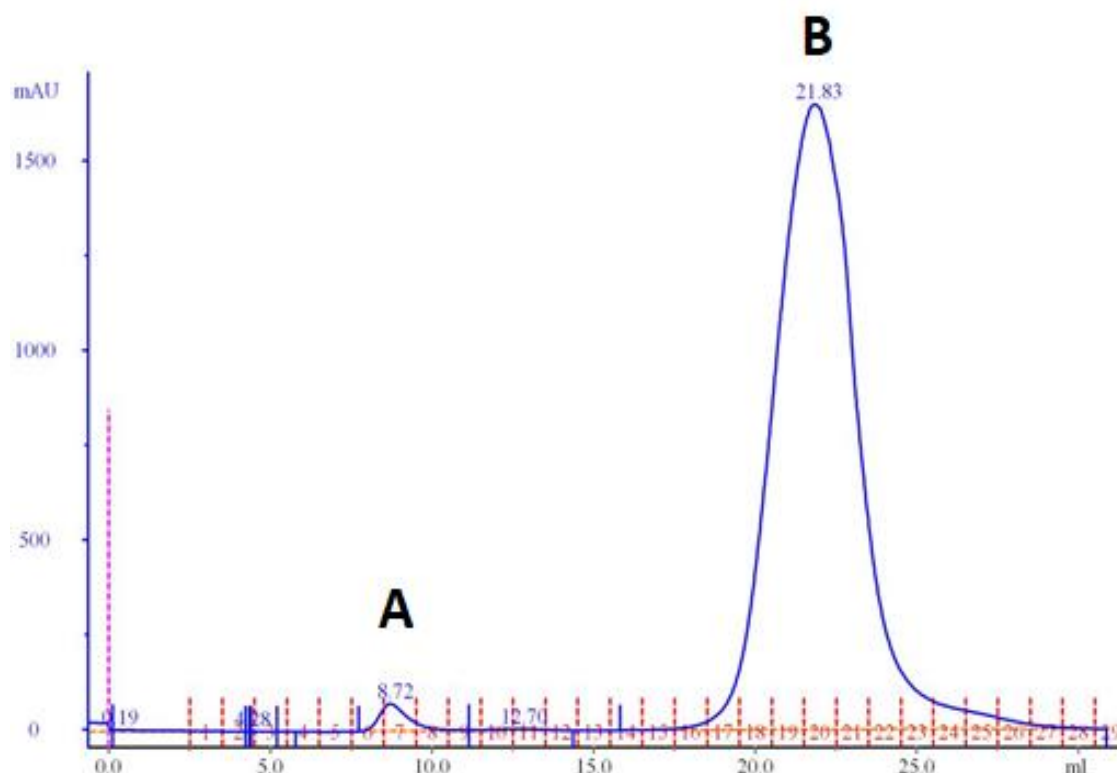


Figura 31. **Cromatograma de exclusión molecular obtenido en la purificación de la inulinasa de *F. incarnatum* CRT 197 (concentración de proteínas liofilizando el sobrenadante).** Se utilizó una columna Superdex 200 con buffer de fosfatos 50 mM pH 6 conteniendo NaCl 500 mM y un flujo de 0.5 mL/min. Se observan dos picos que corresponde a la cantidad de proteína expresada en unidades de absorbancia. El pico A corresponde a la fracción 8 y 9 con volumen de elución de 8.72 mL. El pico B corresponde a las fracciones 21,22,23 y 24 con volumen de elución de 21.83 mL.

En la figura 31 se muestra el cromatograma de exclusión molecular, donde se pueden observar 2 picos que indican la cantidad de proteína en mili unidades de absorbancia (mAU), el pico A con un área de 76.4 mAU*mL y una absorbancia de 72.6 mAU y pico B con área de 4908 mAU*mL y absorbancia de 1647 mAU, además de eluir a los 21.83 mL.

Se obtuvieron 5 fracciones denominadas F19, F20, F21, F22, F23, todas con actividad enzimática de 2.42, 24.72, 20.57, 9.87, 4.34 U/mg prot respectivamente. Las fracciones del pico A no presentaron actividad enzimática.

En la purificación por cromatografía de exclusión molecular utilizando el sobrenadante liofilizado, se obtuvo una mejora notable en el rendimiento de purificación que fue del 72.4 % comparado con el 1.1% de rendimiento enzimático de la purificación por exclusión molecular y precipitando la enzima. Al igual que las veces de purificación llegando a 7 veces (Tabla 9).

Tabla 9. Tabla de purificación de la inulinasa de *F. incarnatum* liofilizando el sobrenadante

Paso de purificación	V (mL)	P (mg/mL)	PT (mg)	AE (U/mL)	AT (U)	AEe (U/mg)	VP	% R
Sobrenadante	50	0.084	4.2	0.755	37.75	8.99	1	100
Liofilizado	1.5	0.23	0.345	5.657	8.48	24.59	2.73	22.4
Exclusión Molecular	5	0.08	0.408	5.471	27.33	66.98	7.45	72.4

7.3.3. Monitoreo del proceso de purificación de la inulinasa de *F. incarnatum* CRT 197

Para monitorear el proceso de purificación de la enzima se realizó una visualización en un gel SDS-PAGE al 15%, con las fracciones purificadas en serie; a esta enzima purificada se le denominó ET-FIGH, utilizando 20 µg/µl de proteína y haciendo una tinción del gel con Comassie. El peso molecular y la intensidad de la banda de proteína en el gel permitieron evaluar la eficiencia del proceso de purificación (Figura 32), como podemos observar la enzima ET-FIGH, se encuentra pura y con peso molecular aproximado de 17 kDa, esto nos hace suponer que es una enzima

que solo cuenta con el dominio barril beta, aunque se encuentra por debajo del peso molecular predicho.

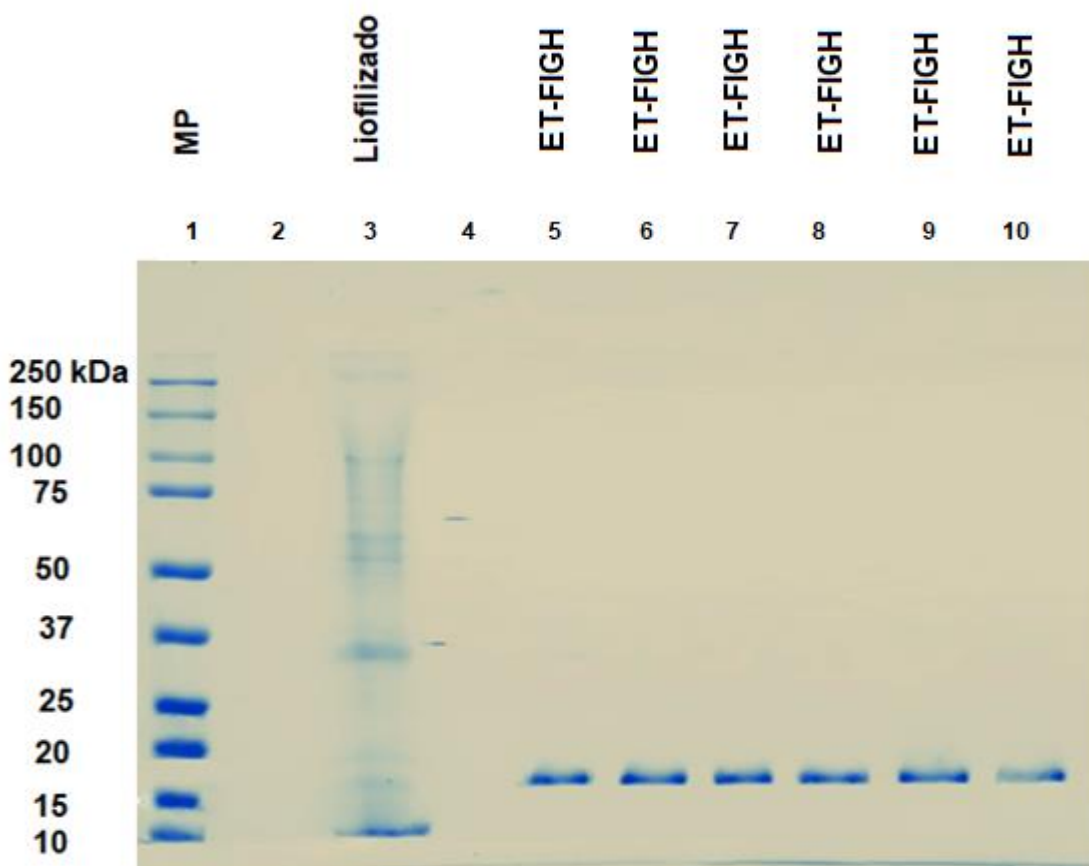


Figura 32. Verificación de la pureza de la enzima por electroforesis en gel SDS-PAGE 15%. En el carril 1 (MP) está el marcador de peso molecular, carril 3 el sobrenadante liofilizado, carril 5 al 10 la enzima ET-FIGH pura de *F. incarnatum* CRT 197, obtenida en la exclusión molecular con un peso molecular alrededor de los 17 kDa.

Sin embargo, comparando con el análisis *in silico*, y de acuerdo con los dos modelos de predicción de la estructura de la inulinasa de *F. incarnatum* CRT 197, se esperaba obtener una enzima con un peso molecular aproximado de 60 o 25 kDa. Cabe señalar que, aunque en el género *Fusarium* esta reportada la enzima de *Fusarium oxysporum*, una endoinulinasa con un peso molecular de 56 kDa y también fue reportada una inulinasa de *Fusarium* sp. con un peso molecular de 90 kDa (Neera *et al.*, 2018), la enzima de *F. incarnatum* CRT 197 está por debajo de

estos pesos moleculares. En las inulinasas de hongos generalmente el peso molecular puede ir desde 30 hasta 175 kDa (Das *et al.*, 2019).

7.3.3. Zimograma del sobrenadante de *F. incarnatum* CRT 197

Se realizó un zimograma con el sobrenadante liofilizado de *F. incarnatum* CRT 197, para determinar si la enzima que se obtuvo en la purificación, no se había degradado, ya que el peso molecular obtenido en la verificación de la pureza de la inulinasas fue de 17 kDa. Se incubó el gel SDS PAGE por 2 horas en una solución con inulina de agave al 8 % y se revelaron los productos de reacción con TTC.

En la figura 33 podemos observar que en el carril 3, la presencia de 3 bandas mostrando actividad enzimática, esta bandas tienen distintos pesos moleculares de entre 100 y 50 kDa, debido a que la enzima comercial Novozyme ®960, es mezcla de exo y endoinulinasas provenientes de *A. niger*. El extracto liofilizado no tiene actividad enzimática inulinasas visible con este tiempo de reacción.

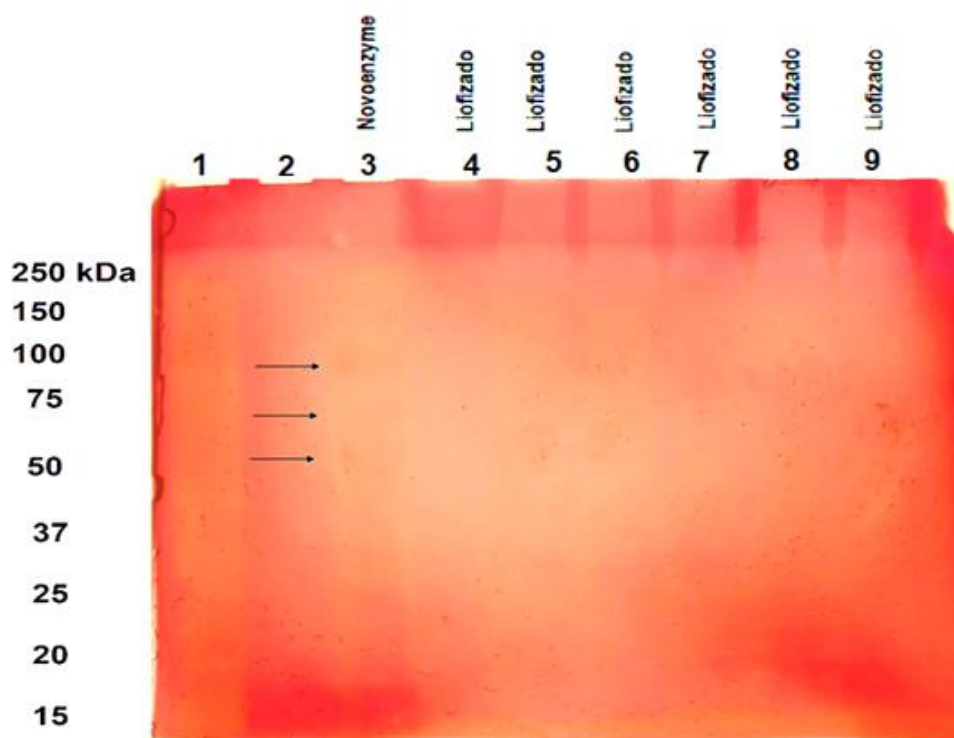


Figura 33. Zimograma de la inulinasas de *F. incarnatum* CRT 197 obtenido por SDS-PAGE 10 % 2 h de reacción. En el carril 3 se observa la enzima comercial Novozyme ®960, mostrando actividad enzimática entre los 100 y 50 kDa, en los siguientes carriles el extracto liofilizado que contiene a la enzima problema sin mostrar actividad enzimática inulinasas visible a las 2 h.

Se incubó otro gel SDS PAGE con la enzima comercial y el extracto liofilizado por 24 h en solución de inulina de agave al 8% y se tiñó con TTC, los resultados revelaron que la enzima Novozyme (carril 3) tiene actividad enzimática entre los 100 y 50 kDa (Figura 34)

En los carriles 7, 8 y 9 el extracto liofilizado de *F. incarnatum* CRT197 que contiene la enzima problema también muestra presencia de bandas de actividad enzimática entre los 20 y 15 kDa. Si lo comparamos con la verificación de la pureza de la enzima podemos observar que efectivamente, es la enzima problema con un peso molecular de 17 kDa.

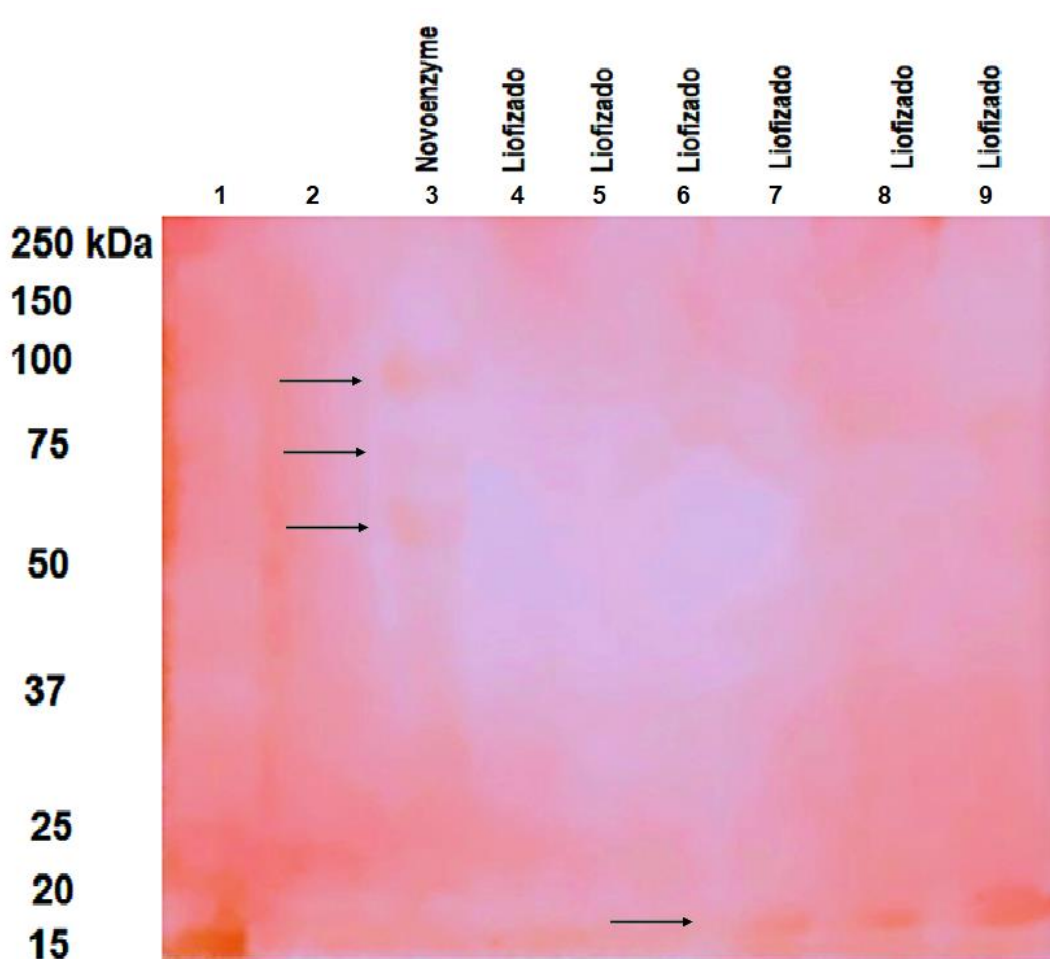


Figura 34. Zimograma de la inulinasa de *F. incarnatum* CRT 197 obtenido por SDS-PAGE 10 % 24 h de reacción. En el carril 3 se observa la enzima comercial Novozyme ®960, mostrando actividad enzimática entre los 100 y 50 kDa, en los carriles 7, 8 y 9 el extracto liofilizado que contiene a la enzima problema mostrando actividad enzimática inulinasa a las 24 h.

7.3.4. Peso molecular de la inulinasa de *F. incarnatum* CRT 197

Además de emplear la electroforesis SDS-PAGE para estimar el peso molecular de la enzima, este se determinó utilizando una curva de calibración obtenida mediante cromatografía de exclusión molecular superdex 200. El peso molecular de la enzima se determinó utilizando el coeficiente de retención (k_a) de la enzima. En la tabla 10 se muestra los valores de peso molecular, volumen de elución y k_a de cada estándar.

Tabla 10. Coeficiente de retención K_a de los estándares

Muestras	Peso molecular	Volumen de elución	Coeficiente de retención (K_a)
Tiroglobulina (bovina)	670	10.33	0.045
Gama-globulina (bovina)	158	13.53	0.268
Ovoalbúmina (gallina)	44	16.66	0.487
Mioglobina (caballo)	17	19.03	0.653
Vitamina B12	1.35	22.75	0.913
Azul dextrano	2000	9.69	-

Con estos valores se obtuvo la curva de log peso molecular de los estándares vs k_a (Figura 35).

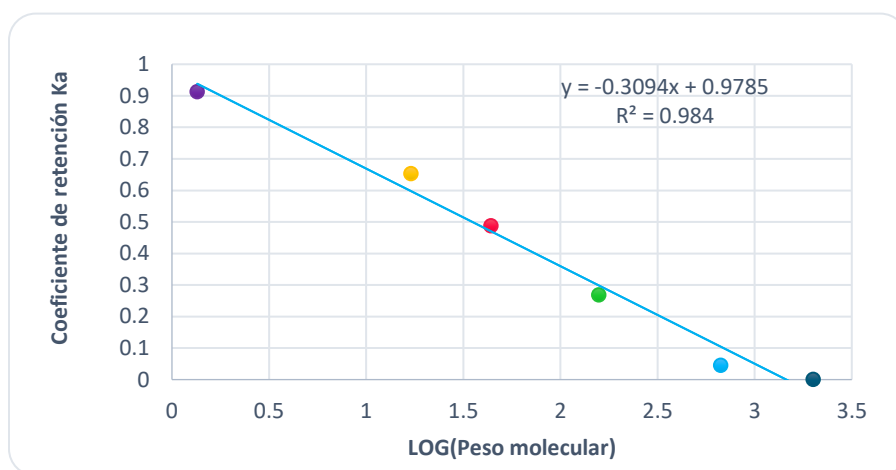


Figura 35. Curva de logaritmo de peso molecular

Para determinar el coeficiente de retención de la enzima se utilizó la siguiente ecuación.

$$\text{Coeficiente de retención (ka)} = \frac{\text{volumen}_{\text{muestra}} - \text{volumen}_{\text{muerto}}}{\text{volumen}_{\text{total}} - \text{volumen}_{\text{muerto}}}$$

Donde

Volumen muestra: Volumen de elución de la muestra

Volumen muerto: Volumen de la elución de azul dextrano

Volumen total: Volumen total de la columna (30 mL)

El volumen de elución de la muestra durante la purificación por cromatografía de exclusión molecular fue de 21.8 mL (véase figura 31), una vez sustituidos los valores en la ecuación el coeficiente de retención de la enzima fue de 0.596.

Se extrapoló este valor en la ecuación de la recta de la curva de log del peso molecular y se obtuvo el inverso para obtener un peso molecular de la enzima de 17 kDa. Si lo comparamos con la electroforesis SDS-PAGE el peso molecular corresponde al obtenido por este método.

7.3.5 Determinación de la Glicosilación de la inulinasa de *F. incarnatum CRT 197*

Con la finalidad de conocer si la enzima purificada presenta glicosilaciones, se llevó a cabo una electroforesis SDS-PAGE con un gel poliacrilamida al 10% y una tinción de Shiff. Se observó una coloración rosa en las bandas de la enzima pura ET-FIGH de *F. incarnatum CRT 197* (Figura 36) lo que indica que la enzima se encuentra glicosilada, y comparándola con el control positivo de peroxidasa de rábano que es una enzima que presenta glicosilaciones.

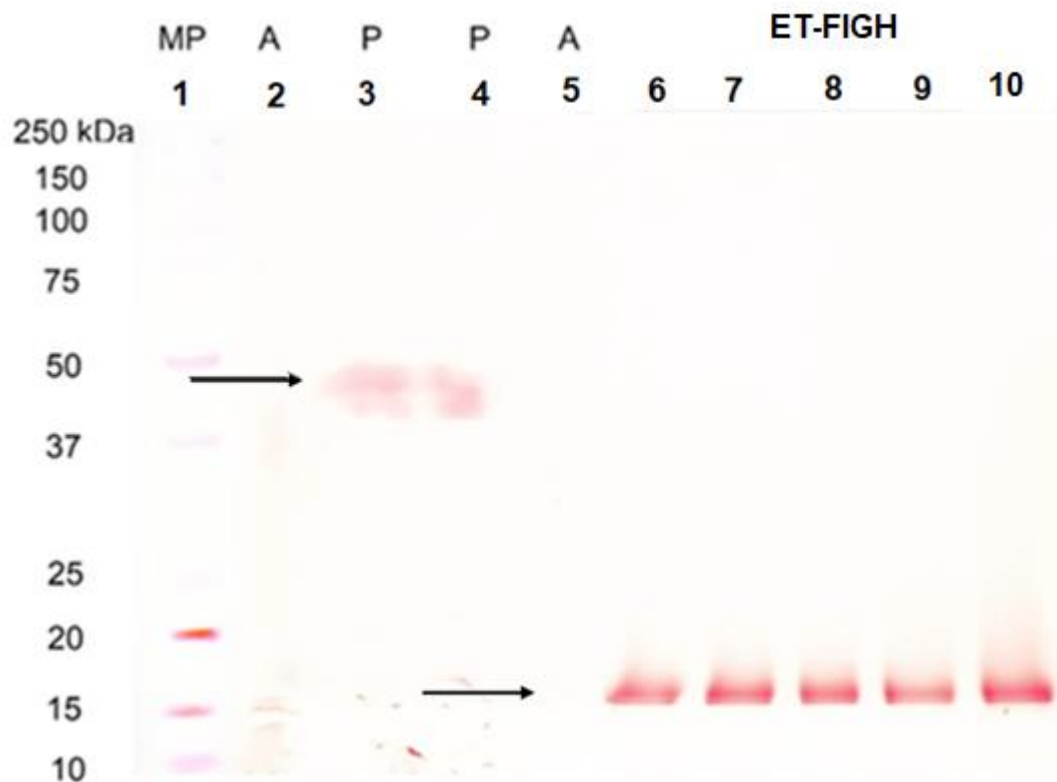


Figura 36. Ensayo de glicosilación de la enzima ET-FIGH de *F. incarnatum* CRT 197 con tinción de Schiff. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular (MP), carril 2 y 5 (A) la albumina bovina (control negativo), carril 3 y 4 (P) la peroxidasa de rábano (control positivo), carril 6 al 10 (ET-FIGH.) la enzima pura.

7.3.6. Determinación de la temperatura óptima para la actividad de la inulinasa de *F. incarnatum* CRT 197

Con la enzima pura ET-FIGH de *F. incarnatum* CRT 197, se realizaron ensayos de actividad enzimática por el método DNS, utilizando inulina de agave al 1% en buffer de acetatos 50 mM y pH 5, variando la temperatura de 30 a 80° C, con la finalidad de determinar la temperatura a la cual la enzima presenta una mayor actividad enzimática inulinasa.

En la siguiente gráfica de temperatura (Figura 37) se muestran los valores de actividad enzimática inulinasa (3 réplicas), vemos que a 50°C la enzima presenta la mayor actividad enzimática de 3590.8 U/mg prot y conforme va subiendo la temperatura esta decrece hasta llegar a la temperatura de 80 °C donde la actividad

enzimática disminuye a 2611 U/mg prot. Con el análisis ANOVA se determinó que el valor-P de la prueba F es menor que 0.05, por lo que, existe una diferencia significativa entre las actividades enzimáticas, con un nivel de significancia del 5%.

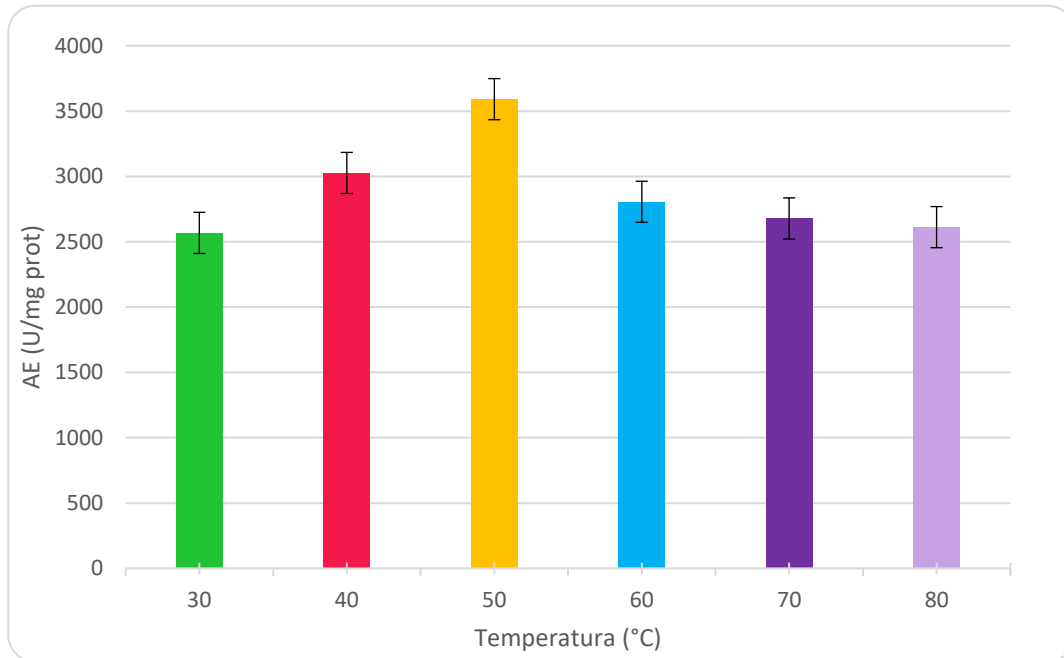


Figura 37. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática específica de la inulinasa de la enzima ET-FIGH de *F. incarnatum* CRT 197. La reacción se llevó a cabo a pH 5 con inulina de agave 1%, a 200 rpm por 30 min variando la temperatura de reacción de 30 a 80°C.

7.3.7. Determinación del pH óptimo para la actividad de la inulinasa de *F. incarnatum* CRT 197

Una vez que se determinó la temperatura de reacción a la cual la enzima presenta su mayor actividad, se realizaron los ensayos de actividad enzimática con la enzima pura con inulina de agave al 1% en buffer de acetatos 50 mM variando el pH de 2.5 a 8 y temperatura de 50°C. La fructosa, producto de la reacción se cuantificó por medio del método DNS. En la figura 38, se muestra la actividad enzimática a los diferentes pH's, a pH 5.5 se observó actividad enzimática inulinasa mayor de 2693 U/mg prot comparándola con el pH 2.5 con 1698 U/mg prot.

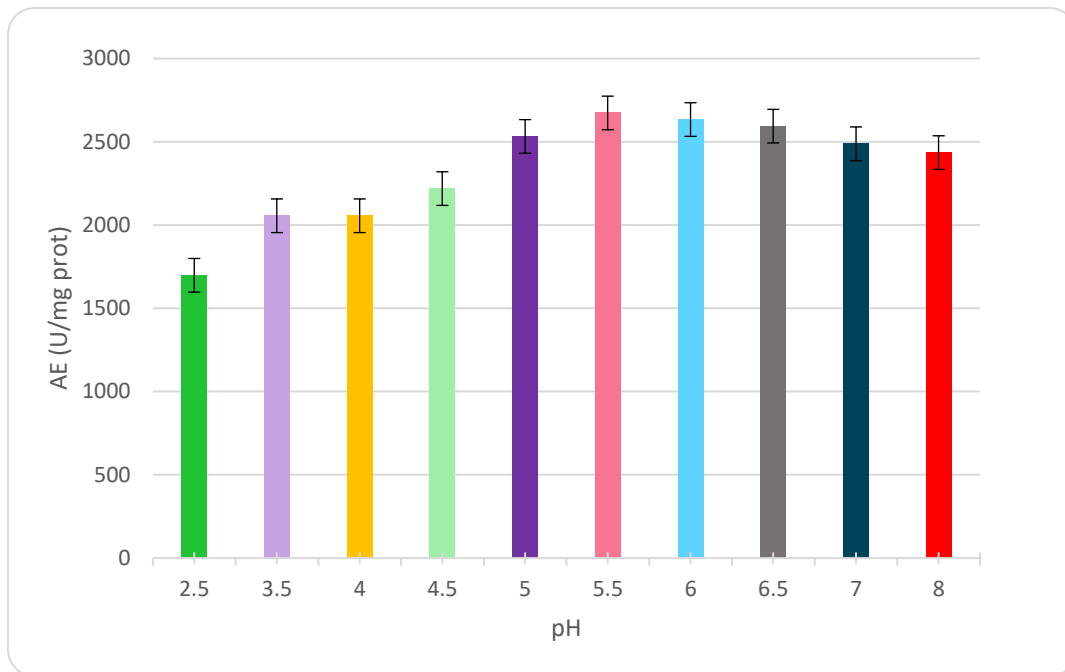


Figura 38. **Actividad enzimática específica de la inulinasa de ET-FIGH de *F. incarnatum* CRT 197 variando el pH.** La reacción se llevó a cabo a Temperatura de 50°C, inulina de agave 1%, a 200 rpm por 30 min.

Para verificar si las diferencias de actividad enzimática son significativas, se realizó un análisis de varianza. El ANOVA mostró que el valor-P (0.15) de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de la actividad enzimática con respecto al pH, con un nivel de significancia del 5%.

Un estudio reveló que *Fusarium spp.*, aislado de la rizosfera de dalia, produjo endoinulinasas en un medio que contenía inulina como fuente de carbono. Se encontró que la temperatura y el pH óptimos de la enzima eran 60 °C y pH 6,0, respectivamente. Comparándolo con los resultados obtenidos de la enzima problema ET-FIGH de *F. incarnatum* CRT 197, la actividad enzimática inulinasa también se lleva a cabo entre ese pH y temperatura. También es notable que la enzima no pierde actividad enzimática, incluso a pH's mayores. A pH 8 la enzima solo pierde alrededor del 10% de actividad.

7.3.8. Determinación de la actividad enzimática de la inulinasa de *F. incarnatum* CRT 197 variando el sustrato

Una vez que se obtuvieron los parámetros de pH y temperatura óptimos de reacción de la enzima ET-FIGH de *F. incarnatum* CRT 197, se realizaron ensayos de actividad enzimática utilizando diferentes sustratos como la inulina de agave al 1%, xilano al 1%, levano al 1% y sacarosa al 0.5%. Se realizó esta determinación con la finalidad de evaluar la actividad de hidrólisis y así compararlo con en análisis *in silico*, puesto que predice que puede tener diferentes actividades.

La enzima presentó mayor actividad a pH 5.5 y temperatura de 50 °C con levano 2775 U/mg prot, mientras que con inulina de agave 2620 U/mg prot, también con xilano tuvo actividad enzimática de 2331 U/mg prot (Figura 39).

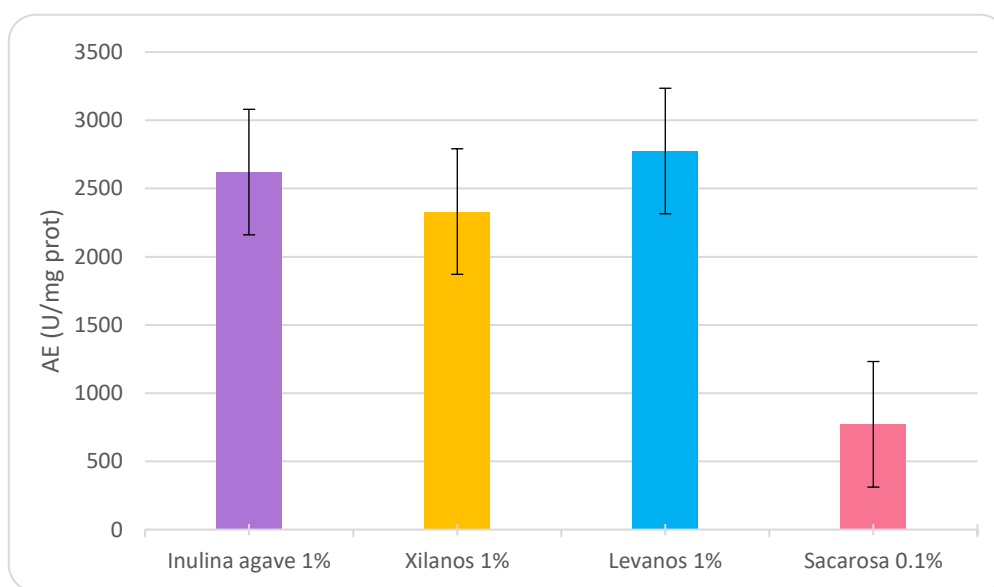


Figura 39. **Actividad enzimática específica de hidrólisis de la enzima ET-FIGH de *F. incarnatum* CRT 197 variando el sustrato.** La reacción se llevó a cabo a pH 5.5 y temperatura de 50°, inulina de agave 1%, a 200 rpm por 30 min.

La enzima ET-FIGH de *F. incarnatum* CRT 197, con todos los sustratos evaluados, presentó actividad enzimática, se decidió realizar un ANOVA, los resultados de la prueba mostraron que el valor-P (0.75) de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no

existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de la actividad enzimática con respecto al sustrato, con un nivel de significancia del 5%.

Por lo tanto, la enzima ET-FIGH no hay diferencias significativas en la actividad enzimática de hidrolisis con los sustratos inulina de agave, levano, xilano en cuanto a la sacarosa, presenta menor actividad enzimática frente a este sustrato. Se necesitarían realizar un análisis de los parámetros cinéticos de la enzima como k_m para determinar con sustrato la enzima ET-FIGH de *F. incarnatum* CRT 197, tiene mayor afinidad.

Se determinó también el pH y temperatura óptima de reacción para el sustrato sacarosa utilizando temperaturas de 30, 40, 50 y 60°C, y posteriormente pH de 4, 4.5, 5, 5.5 y 6. Para posteriormente poder realizar una TLC y observar si la enzima ET-FIGH lleva a cabo reacción de transfructosilación.

Se estableció una temperatura de reacción de 50 °C y pH de 5.5 como la de mayor actividad enzimática (Figura 40). En la literatura está reportado que, por ejemplo, en *Acetobacter diazotrófico SRT4* la enzima purificada presenta actividad a un pH óptimo de 5.0, en *Zymomonas mobilis*, la enzima presenta actividad hidrolasa a 50 °C, en general las levansacaros tienen actividad en un intervalo de temperatura de 35 a 50 °C, y pH entre 4 y 8 (Li Shuhuai *et al.* 2015).

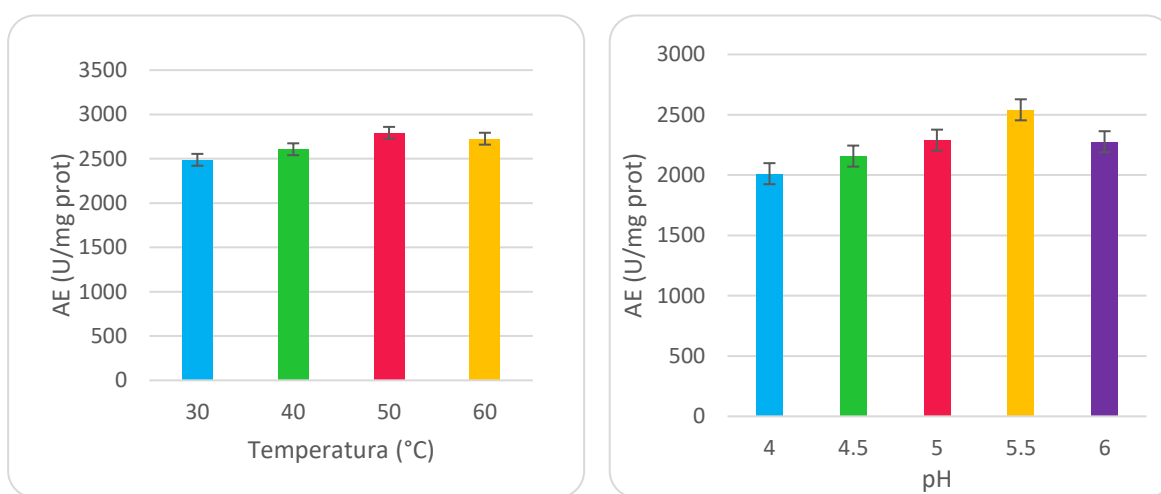


Figura 40. **Actividad enzimática específica de la inulinasa de ET-FIGH de *F. incarnatum* CRT 197 a diferentes temperaturas pH con sacarosa al 1%.** La reacción se llevó a cabo a pH 5, 200 rpm por 30 min variando la temperatura de reacción. Para medir la actividad enzimática de ET-FIGH variando el pH, se utilizó temperatura de 50°C.

7.3.9. Análisis de los productos de reacción con sacarosa e inulina de agave

Para verificar si la enzima ET-FIGH de *F. incarnatum* CRT 197 presenta actividad exo o endoinulinasa y si tiene actividad de transfructosilación, así como visualizar los productos de reacción, se realizó una cromatografía en capa fina (TLC). En la reacción de transfructosilación se utilizó una solución de sacarosa al 1 y 10%, y una solución de inulina de agave al 1% para la reacción de hidrólisis. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo a pH 5 y temperatura de 50°C.

En la TLC se observa que la enzima ET-FIGH produce un compuesto de alto peso molecular, que podría ser un polímero a los 30 min de reacción con sacarosa al 1 y 10 % (Figura 41, cuadro rosa A y B). A las 24 horas de reacción observamos la hidrólisis de la sacarosa y la enzima libera fructosa (Figura 41, cuadro azul C y D). Estos resultados preliminares sugieren que la enzima podría estar llevando a cabo la reacción de síntesis de fructanos e hidrólisis de la sacarosa, sin embargo, es necesario realizar estudios más profundos que nos permitan demostrar esta actividad.

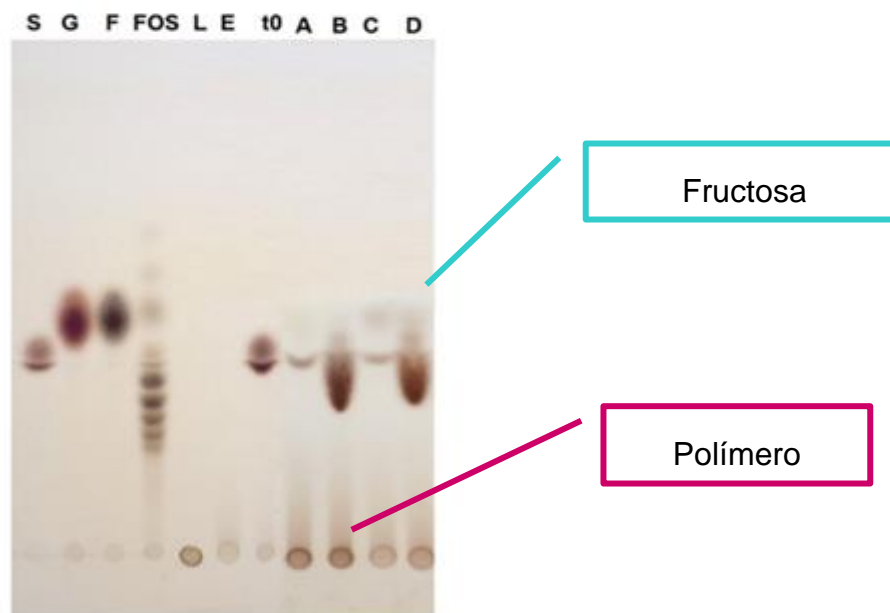


Figura 41. **Cromatografía en capa fina TLC con sacarosa.** En el carril (S) se encuentra la sacarosa 1%, carril (G) glucosa 5%, carril (F) fructosa 5%, carril (FOS) fructooligosacáridos 5%, carril (L) levano 1%, carril (E) enzima ET-FIGH, carril (t0) tiempo cero de reacción, carril (A) y (B) reacción de la enzima ET-FIGH de *F. incarnatum* CRT 197 con sacarosa 1% y 10% respectivamente al tiempo 30 min, carril (C) Y (D) reacción de la enzima ET-FIGH con sacarosa 1 y 10% respectivamente al tiempo 24 h.

Con inulina de agave al 1% se llevó a cabo la reacción de hidrólisis de la inulina. En la figura 42, tenemos aparentemente formación de fructooligosacáridos (cuadro rojo) y fructosa (cuadro verde) a las 2 y 24 horas de reacción. La enzima posiblemente tiene actividad endoinulinasa, al hidrolizar aleatoriamente los enlaces glucosídicos de la agavina o bien podría ser productos de la hidrólisis enzimática.

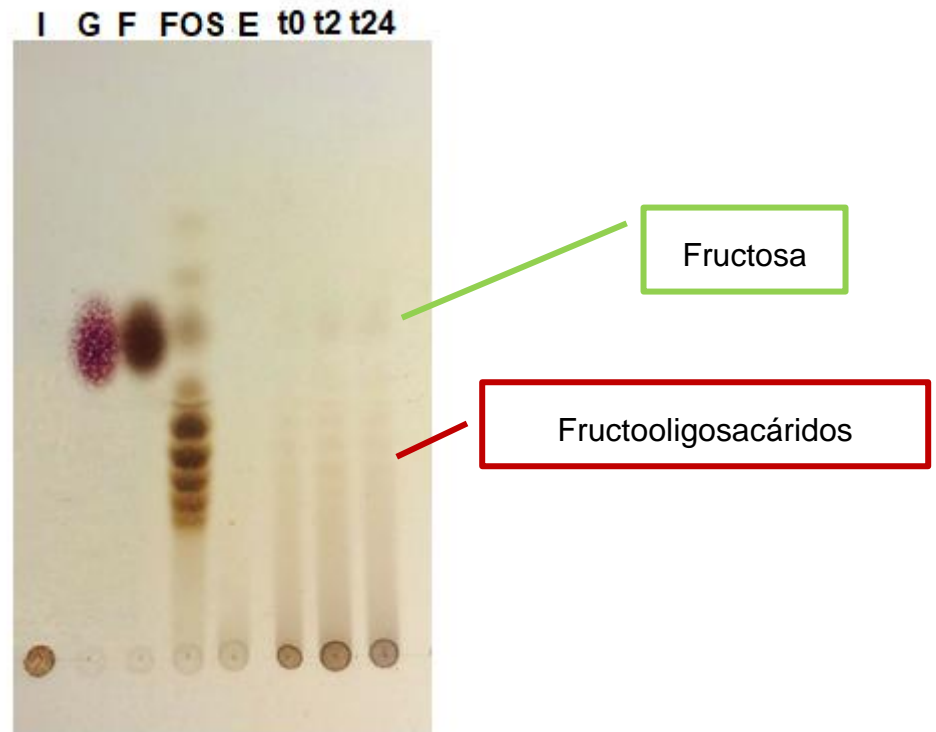


Figura 42. **Cromatografía en capa fina TLC con agavina** al 1%. En el carril (I) inulina de agave al 1%, carril (G) glucosa 5%, carril (F) fructosa 5%, carril (FOS) fructooligosacáridos 5%, carril (E) enzima ET-FIGH de *F. incarnatum* CRT 197, carril (t0, t2, t24) reacción de la enzima ET-FIGH con inulina de agave 1% al tiempo cero, 2 y 24 h.

En el género *Fusarium*, se reportó que *F. oxysporum* produce una endoinulinasa (J.-K. Yang *et al.*,2016), esta enzima presenta una estructura que contiene el dominio beta sándwich y el beta propela y su peso molecular es aproximado de 56 kDa. Si la comparamos con la enzima ET-FIGH de *F. incarnatum* CRT 197 de 17 kDa, esta tiene actividad enzimática endoinulinasa, pero tienen diferencias en peso molecular.

8. CONCLUSIONES

Se determinó la filogenia molecular de la enzima hipotética XP_031019455.1 y XP_031021624. *Fusarium incarnatum* (FIESC28_02354 [*Fusarium coffeatum*]). El árbol filogenético mostró las relaciones evolutivas entre ambas enzimas, concluyendo que pertenecen a clados hermanos. Lo que nos permitió elegir a estas dos enzimas, para realizar el modelo de la predicción de la estructura de la inulinasa de *F. incarnatum*. Se determinó la predicción del modelo de la estructura de la inulinasa de *F. incarnatum*, uno con la enzima XP_031019455.1 cuyo modelo es una inulinasa de la familia GH32 y con la enzima XP_031021624.1 el modelo es una β propela que contienen los aminoácidos catalíticos en el sitio activo, los dos aparticos (D) y el glutámico (E).

Los resultados obtenidos durante la experimentación indicaron que la actividad enzimática de la inulinasa producida por *F. incarnatum* CRT 197 se vio afectada dependiendo de la fuente de carbono. Siendo la inulina de agave al 1% como fuente de carbono y el extracto de levadura como fuente de nitrógeno los sustratos preferenciales de *F. incarnatum* para obtener mayor actividad enzimática.

Con la concentración de la enzima liofilizando el sobrenadante y purificándola por cromatografía de exclusión molecular, se obtuvo un rendimiento del 72.4 % y una enzima pura a la que se le denominó como ET-FIGH con peso molecular de 17 KDa, lo que nos sugiere que es una enzima pequeña, que probablemente tiene solo el dominio β -propela, no formado completamente, al ser una secuencia de aminoácidos corta, pero que en el sitio activo si está presente la triada catalítica.

La enzima ET-FIGH exhibió actividad enzimática inulinasa en un rango de temperatura de 30 a 80°C, sin mostrar alguna diferencia significativa en dicha actividad. Con respecto al pH, la enzima no pierde actividad enzimática, incluso a pH's mayores como a pH 8 la enzima solo pierde alrededor del 10% de actividad.

En el análisis de TLC se observó preliminarmente la producción de un polímero a los 30 min de reacción e hidrolisis de los mismos a las 24 h, utilizando sacarosa como sustrato, sugiriendo la probable síntesis de fructanos. Mientras que con inulina

de agave se observaron posibles FOS y fructosa, productos de la hidrólisis de la inulina. Lo que sugiere que la enzima ET-FIGH de *F. incarnatum* CRT 197, tiene actividad de polimerización, hidrólisis, y actividad endoinulinasa.

9. PERSPECTIVAS

1. Conocer los parámetros cinéticos de la enzima K_m , V_{max} .
2. Realizar la secuenciación de la enzima ET-FIGH de *F. incarnatum* CRT 197 y así conocer un modelo de la estructura tridimensional
3. Expresar a la enzima en forma recombinante y compararla con la silvestre

10. REFERENCIAS

- Abad G. A. (2021). "Producción y caracterización de una fructosilhidrolasa de *Bacillus amyloliquefaciens* 12GeP recombinante", UNAM –Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales.
- Benkert, P., Biasini, M., & Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics* (Oxford, England), 27(3), 343–350. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq662>
- Bioinformatics at COMAV is licensed under a Creative Commons Reconocimiento 4.0 Internacional Licens: https://bioinf.comav.upv.es/courses/intro_bioinf/filogenias.html
- Botero G.J. F., Ibarra H. E.B., Cortés A.C. (2010). Ingeniería de Tequilas, Universidad Nacional de Colombia. Colombia.
- Cho, Y. J., & Yun, J. W. (2002). Purification and characterization of an endoinulinase from *Xanthomonas oryzae* No.5. *Process Biochemistry* (Barking, London, England), 37(11), 1325–1331. [https://doi.org/10.1016/s0032-9592\(02\)00018-3](https://doi.org/10.1016/s0032-9592(02)00018-3).
- García M.A.J. (2007). Los Agaves de México., Ciencias, julio-septiembre, numero087., Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito federal, Mexico,
- Gschaedler M. A. (2017). PANORAMA DEL APROVECHAMIENTO DE LOS AGAVES EN MÉXICO, agared- Red Temática Mexicana.

- Gupta R.K. (2017). Foodborne infectious diseases. Food Safety in the 21st Century, Elsevier.
- Hakobyan, L., Gabrielyan, L., & Trchounian, A. (2012). Yeast extract as an effective nitrogen source stimulating cell growth and enhancing hydrogen photoproduction by *Rhodobacter sphaeroides* strains from mineral springs. International Journal of Hydrogen Energy, 37(8), 6519–6526. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.01.077>
- Hu, X.J. (2020). The crystal structure of exoinulinase INU1. Worldwide Protein Data Bank. <https://doi.org/10.2210/pdb6j0t/pdb>
- Jabeen, A., Mohamedali, A., & Ranganathan, S. (2019). Protocol for protein structure modelling. Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology (pp. 252–272). Elsevier.
- Kamble, P. P., Suryawanshi, S. S., Jadhav, J. P., & Attar, Y. C. (2019). Enhanced inulinase production by *Fusarium solani* JALPK from invasive weed using response surface methodology. Journal of Microbiological Methods, 159, 99–111. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.02.021>
- Khor, B. Y., Tye, G. J., Lim, T. S., & Choong, Y. S. (2015). General overview on structure prediction of twilight-zone proteins. Theoretical Biology & Medical Modelling, 12(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s12976-015-0014-1>
- Lafraya A.A. (2011). Análisis Molecular, Modificación Funcional Y Producción De Enzimas Susceptibles De Ser Utilizadas En La Síntesis De Fructooligosacáridos. Valencia. Consejo Superior de la Ciencia
- Lammens, W., Le Roy, K., Schroeven, L., Van Laere, A., Rabijns, A., & Van den Ende, W. (2009). Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications. Journal of Experimental Botany, 60(3), 727–740. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern333>
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2008). The *Fusarium* Laboratory Manual. Wiley-Blackwell.
- LI Dong-hua. (2012). Pathogenic variation and molecular characterization of *Fusarium* species isolated from wilted sesame in China. African Journal of Microbiology research, 6(1). <https://doi.org/10.5897/ajmr11.1081>

- Lima, E. N., Oster, A. H., Bordallo, P. N., Araújo, A. A. C., Silva, D. E. M., & Lima, C. S. (2021). A novel lineage in the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex is one of the causal agents of *Fusarium* rot on melon fruits in Northeast Brazil. *Plant Pathology*, 70(1), 133–143. <https://doi.org/10.1111/ppa.13271>
- Lu, S., Wang, J., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Yang, M., Zhang, D., Zheng, C., Lanczycki, C. J., & Marchler-Bauer, A. (2020). CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D265–D268. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz991>
- Mackerell, A. D., Jr. (2004). Empirical force fields for biological macromolecules: overview and issues. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1584–1604. <https://doi.org/10.1002/jcc.20082>
- Mendoza L.P.A. (2021). Evaluación de *Fusarium verticillioides* para la producción de enzimas de interés biotecnológico. Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Química.
- Miguel Nava A.F. (2021). Evaluación de la producción de inulinasa en *Fusarium* sp. Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Química.
- MolProbity: Chenn V.B., Arendall W.B., Headd J.J., Keedy D.A., Immormino R.M., Kapral G.J., Murray L.W., Richardson J.S., & Richardson D.C. (2010). All-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Cryst. D*66, 16-21.
- National Center for Biotechnology Information; [1988] – [cited 2021 Apr 25]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Nunpan, S., Suwannachart, C., & Wayakanon, K. (2019). Effect of Prebiotics-Enhanced Probiotics on the Growth of *Streptococcus mutans*. *International Journal of Microbiology*, 2019, 4623807. <https://doi.org/10.1155/2019/4623807>

- Olvera, C., López- Munguía, A. (2014). Agroindustrial synthesis of fructans from sucrose. *Biotechnology: beyond borders. Proceedings of the Indo-Mexico Workshop on Biotechnology held at CSIR-NCL Pune, India Oct 7-9 2013*, 334-347.
- Protein [Internet]. Submitted (22-OCT-2019) National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA. Accession No. XP_031019455, *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex species 28; [cited 2021 06 21]. Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=\(fusarium+incarnatum\)+AND+%22Fusarium+coffeatum%22%5Bporgn%3A_txid231269%5D+inu](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=(fusarium+incarnatum)+AND+%22Fusarium+coffeatum%22%5Bporgn%3A_txid231269%5D+inu)
- PyMOL The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.
- QMEAN. Benkert, P., Biasini, M., Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics* 27, 343-350. <https://swissmodel.expasy.org/interactive>
- Raga-Carbajal, E., Díaz-Vilchis, A., Rojas-Trejo, S. P., Rudiño-Piñera, E., & Olvera, C. (2021). The molecular basis of the nonprocessive elongation mechanism in levansucrases. *The Journal of Biological Chemistry*, 296(100178), 100178. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.015853>
- Ramírez, J. (1995) Los magueyes, plantas de infinitos usos. CONABIO. *Biodiversidad* 3:1-7.
- Randy R., Alexandre G. U., Vladimir Y. L. (2013). *Advancing Methods for Biomolecular Crystallography*. Springer.
- Resendiz N., Sentías A., Dreckmann K., Meave del Castillo M., Zamudio R. (2019). *Sistemática filogenética aplicada a la Ficología Marina*, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.
- Ricca, E., Calabrò, V., Curcio, S., & Iorio, G. (2007). The state of the art in the production of fructose from inulin enzymatic hydrolysis. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27(3), 129–145. <https://doi.org/10.1080/07388550701503477>

- Sabater-Molina, M., Larqué, E., Torrella, F., & Zamora, S. (2009). Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 65(3), 315–328. <https://doi.org/10.1007/BF03180584>
- Sosa-Herrera, M. G., Delgado-Reyes, V. A. (2017). Propiedades funcionales y aplicaciones tecnológicas de fructanos. En *Propiedades Funcionales de hoy* (pp. 97–116). OmniaScience.
- Sudhir Kumar, Glen Stecher, Michael Li, Christina Knyaz, & Koichiro Tamura (2018) MEGA-X X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549
- Tapia C. (2014). Genero *Fusarium*, Programa de Microbiología y Micología Instituto de Ciencias Biomédicas Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Rev. Chilena Infectol.
- Trapala, J., Bustos-Jaimes, I., Manzanares, P., Bárzana, E., & Montiel, C. (2020). Purification and characterization of an inulinase produced by a *Kluyveromyces marxianus* strain isolated from blue agave bagasse. *Protein Expression and Purification*, 176(105718), 105718. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105718>
- Trujillo G.R. (2015) Purificación Y Caracterización Bioquímica De Una B-Fructofuranosidasa Con Actividad Fructosiltransferasa Producida Por La Levadura *Torulaspota delbrueckii*., Guadalajara Jalisco.
- UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. *J Comput Chem*. 2004 oct;25(13):1605-12.
- Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M., & Martínez-Escudero, E. (2014). Situación actual en el control de *Fusarium spp.* y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta agronómica*, 64(2), 194–205. <https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>
- Vinuesa, V. (2011). Conceptos básicos de homología y filogenética Introducción a la Filoinformática - Instituto de Ecología, UNAM.

- Yang, J.-K., Zhang, J.-W., Mao, L., You, X., & Chen, G.-J. (2016). Genetic modification and optimization of endo-inulinase for the enzymatic production of oligofructose from inulin. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, 134, 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.10.020>