



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**“Producción de fructooligosacáridos por la inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* ISO3 recombinante y el efecto de las mutaciones W79A y F113A “**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Laura Jeanine Tafoya Olivos

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Carmina Montiel Pacheco  
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Lilian González Segura  
Facultad de Química, UNAM

Dra. Romina Rodríguez Sanoja  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Ciudad Universitaria, CD. MX. 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **Agradecimientos**

Agradezco por el financiamiento otorgado a los proyectos DGAPA PAPIIT  
IN2 14123 y IN219520

Así como a la Facultad de Química por el apoyo PAIP 9153

Un agradecimiento especial a CONACYT por la beca de maestría otorgada

A los miembros del Comité Tutor:

Dra. Lilian González Segura, Dra. Romina Rodríguez Sanoja y Dra. Carmina Montiel Pacheco quien también funge como mi tutora de tesis; por su valioso acompañamiento durante la realización de este trabajo

A los integrantes del H. Jurado por las observaciones que me brindaron para poder hacer las correcciones adecuadas de esta tesis

## Contenido

Lista de figuras, tablas y gráficas.....	4
Resumen.....	9
I. Marco teórico.....	11
II.1 Prebióticos.....	11
II.2 Fructooligosacáridos (FOS).....	16
II.3 Familia GH32 y GH68 de glico-hidrolasas.....	19
Fructosiltransferasas.....	23
Inulinasas.....	24
Mecanismo de reacción de enzimas transfructosilantes e hidrolíticas.....	25
Aplicación de mutagénesis de sitio dirigido en enzimas de la familia GH32.....	27
Inulinasa ISO3 de <i>K. marxianus</i> .....	29
II. Justificación.....	30
III. Hipótesis y objetivos.....	31
III.1 Hipótesis.....	31
III.2 Objetivo general.....	31
Objetivos particulares.....	31
IV. Materiales y Métodos.....	31
IV.1 Análisis estructural de Inulinasa ISO3 con respecto a organismos productores de enzimas transfructosilantes.....	31
IV.2 Obtención de rINU-ISO3 y mutantes.....	33
IV.3 Mutagénesis sitio-dirigida.....	35
Para la construcción de plásmidos se usaron los métodos de Xia y Trapala que se describen a continuación:.....	35
IV.4 Expresión de Inu-ISO3 recombinante (rINU-ISO3) y sus mutantes.....	38
IV.5 Purificación de la inulinasa.....	39
IV.6 Determinación de la cantidad de proteína soluble.....	40
IV.7 Determinación de la actividad de transfructosilación.....	40
V. Resultados y discusión.....	43
V.1 Análisis estructural de Inulinasa ISO3.....	43
Alineamientos con BLAST.....	43
Dinámica molecular de rINU-ISO3.....	45
V.2 Expresión de la rINU-ISO3.....	63
V.3 Análisis de la actividad enzimática.....	66

Efecto de la temperatura y pH en la actividad hidrolítica .....	66
Actividad de transfructosilación .....	68
Determinación de la relación hidrólisis-transfructosilación. ....	70
V.4 Obtención de las mutantes de rINU-ISO3.....	74
Seguimiento de la expresión de las mutantes W79A y F113A .....	77
Purificación de las mutantes W79A y F113A.....	80
V. Conclusiones.....	86
VI. Perspectivas.....	87
VII. Referencias .....	88
VIII. ANEXO A.....	99

## Lista de figuras, tablas y gráficas

<b>Figura 1.</b> Ejemplos de estructuras de prebióticos (González Díaz et al., 2020; Rentschler et al., 2015).....	15
<b>Figura 2.</b> Estructura de una exo-inulinasa de <i>Kluyveromyces marxianus</i> (PDB 6J0T) perteneciente a familia GH32 y los motivos conservados, donde se encuentra la triada catalítica marcados de colores morado, azul y rojo.....	20
<b>Figura 3.</b> Aminoácidos que forman el bolsillo hidrofóbico en amarillo y verde agua, y la triada catalítica en anaranjado y verde de exo-inulinasa de <i>A. awamori</i> (PDB 1Y4W) y exo-inulinasa de <i>K.marxianus</i> (PDB 6J0T) respectivamente.....	21
<b>Figura 4.</b> Alineamientos de enzimas fructoexohidrolasas (FEH) e invertasas provenientes de distintas plantas (Van den Ende et al., 2009).....	22
<b>Figura 5.</b> <i>Bolsillo hidrofóbico y zona variable cerca del motivo catalítico ácido/base (EC) de la fructoexohidrolasa e invertasa, de Chichorium intybus y Arabidopsis thaliana respectivamente (Tomado de van den Ende et al., 2009). A: Los aminoácidos que pertenecen a la tríada catalítica se muestran en rojo y la zona variable se muestra en azul. B: Comparación de los sitios activos y la zona variable de fructoexohidrolasa de Chichorium intybus y una invertasa de Arabidopsis thaliana, ambos en complejo con sacarosa.</i> .....	23
<b>Figura 6.</b> Mecanismo catalítico de enzimas transfructosilantes e hidrolíticas propuesto por Jitrayut Jitnonom. Es un mecanismo de 2 pasos un ataque nucleofílico realizado por el ácido aspártico y una deprotonación del grupo donador dependiendo de la reacción (agua o sacarosa).....	26
<b>Figura 7.</b> Aminoácidos de la tríada catalítica en gris y aminoácidos modificados en anaranjado en una fructosilexohidrolasa de <i>Cichorium intybus</i> (PDB 1ST8), para obtener las posiciones de los aminoácidos que convierten la actividad de transglicosilación en una actividad de invertasa. <b>A</b> fructosilexohidrolasa silvestre, <b>B</b> fructosilexohidrolasa con las mutantes W161Y y N166S.....	27
<b>Figura 8.</b> Aminoácidos de la tríada catalítica en gris y aminoácidos modificados en magenta en una invertasa de <i>Arabidopsis thaliana</i> (PDB 2AC1), para obtener las posiciones de los aminoácidos que aumentan la capacidad de transfructosilación hasta 17 veces más de una invertasa de <i>Arabidopsis thaliana</i> . <b>A</b> invertasa silvestre, <b>B</b> invertasa con las mutantes W20Y y N22S .....	28
<b>Figura 9.</b> Aminoácidos de la tríada catalítica en verde y aminoácidos modificados en anaranjado en una fructofuranosidasa de <i>Schwanniomyces occidentalis</i> (PDB 3U14), para obtener las posiciones de los aminoácidos que aumentan la capacidad de transfructosilación de 1 a 5 veces más que de $\beta$ -fructofuranosidasa silvestre de <i>Sw. Occidentalis</i> . <b>A</b> fructofuranosidasa silvestre, <b>B</b> fructofuranosidasa con las mutantes N254A y Q228T .....	29
<b>Figura 10.</b> Alineamientos de secuencias con INU-ISO3, invertasas y fructosiltransferasas en el primer motivo conservado, para encontrar los aminoácidos que se diferencian entre enzimas.....	43
<b>Figura 11.</b> Alineamientos del dominio conservado WMNDPNG entre enzimas invertasas (INV) y transfructosilasas (6SFT y 1SST), realizados por el grupo de Ritsema y colaboradores (2006).....	44

<b>Figura 12.</b> Alineamiento de INU-ISO3 (6J0T) y Beta-fructofuranosidasa (3U14) para identificar si la glutamina que modifica el grupo de Julia Sanz y la inulinasa se encuentran en la misma posición. <b>A:</b> Alineamiento de 6J0T y 3u14 (Beta-fructofuranosidasa) en verde con azul Q228 de la 3u14, en anaranjado con azul Q236 de 6J0T, <b>B:</b> Interacción entre el residuo Q236 y la sacarosa como sustrato. ....	45
<b>Figura 13.</b> RMSD de rInu-ISO3 (Color azul) y el complejo rINU-ISO3 con sacarosa (Color rojo), las dinámicas se llevaron a cabo por 10 ns a una temperatura de 50°C a 1 atm de presión.....	47
<b>Figura 14.</b> Interacciones entre los aminoácidos de menor energía de unión del complejo enzima-sustrato. Por un lado, W79 forma un puente de hidrógeno en la posición -1 y por otro F113 y W335 interacciones tipo stacking en la posición -1 y +1 respectivamente. ....	49
<b>Figura 15.</b> Aminoácidos propuestos para realizar mutaciones de la rINU-ISO3 en color anaranjado.....	50
<b>Figura 16. A:</b> Comparación de cavidad catalítica de rINU-ISO3 con una distancia de aproximada de 12.5 Å y la mutante F113A con una distancia aproximada de 13.9 Å, como referencia se tomó el aminoácido Y323 para medir la distancia de la cavidad catalítica, <b>B:</b> Interacción de F113 con sacarosa con una distancia de 5.4 Å y la interacción entre A113 con sacarosa con una distancia de 7.1 Å.....	51
<b>Figura 17.</b> RMSD de F113A (Color azul) y el complejo F113A con sacarosa (Color rojo), las dinámicas se llevaron a cabo por 10 ns a una temperatura de 50°C a 1 atm de presión. ....	52
<b>Figura 18.</b> Comparación de la posición de sacarosa a tiempo inicial y final (10 ns) en color azul y amarillo respectivamente en la enzima con mutante F113A, la dinámica molecular se llevó a cabo a 50°C, a 1 atm de presión por 10 ns.....	53
<b>Figura 19. A:</b> Comparación de la superficie de la cavidad catalítica en el cambio de W79A, se tomó como referencia el mismo aminoácido (Y237) para medir la distancia. <b>B;</b> Interacción de W79 con sacarosa con una distancia de 3.2 Å y la interacción entre A79 con sacarosa con una distancia de 6.4 Å.....	55
<b>Figura 20.</b> RMSD de W79A (Color azul) y el complejo W79A con sacarosa (Color rojo), las dinámicas se llevaron a cabo por 10 ns a una temperatura de 50°C a 1 atm de presión. ....	56
<b>Figura 21.</b> Comparación de la posición de sacarosa a tiempo inicial y final en color verde y gris respectivamente en la enzima con mutante W79A .....	57
<b>Figura 22. A:</b> Comparación de la superficie de la cavidad catalítica en el cambio de rINU-ISO3 mutante W50F, <b>B:</b> Interacción entre W50 y sacarosa a 5.5 Å, y la interacción entre F50 y sacarosa a 6.2 Å.....	58
<b>Figura 23.</b> RMSD de W50F (Color azul) y el complejo W50F con sacarosa (Color rojo), las dinámicas se llevaron a cabo por 10 ns a una temperatura de 50°C a 1 atm de presión. .	60
<b>Figura 24.</b> Comparación de la superficie de la cavidad catalítica en el cambio de Q236T	61
<b>Figura 25.</b> RMSD de Q236T (Color azul) y el complejo Q236T con sacarosa (Color rojo), las dinámicas se llevaron a cabo por 10 ns a una temperatura de 50°C a 1 atm de presión. ....	62
<b>Figura 26.</b> Seguimiento de la expresión de la rINU-ISO3 .....	63
<b>Figura 27.</b> Cromatograma obtenido del paso de la purificación del sobrenadante de la enzima recombinante, la purificación arrojó tres señales (A, B y C), además en color verde	

se observa el gradiente de Imidazol que se utilizó en la purificación. C es la proteína de interés.....	64
<b>Figura 28.</b> Gel de poliacrilamida al 10% SDS-PAGE, teñido con Azul de Coomassie, En el carril PM se encuentra el marcador de peso molecular, carril rINU-ISO3: Enzima recombinante purificada. ....	65
<b>Figura 29.</b> Efecto de la temperatura (A) y pH (B) en la reacción de rINU-ISO3 sobre la hidrólisis de sacarosa. Las reacciones se llevaron a cabo a pH 4.5 con sacarosa 120 mM, , las reacciones se llevaron a cabo a 60°C con sacarosa 120 mM.....	67
<b>Figura 30.</b> <i>Determinación de condiciones óptimas de concentración de sustrato y tiempos de reacción para la transfructosilación. Los controles de sacarosa, fructosa y FOS se colocaron en una concentración de 1% m/v en buffer de acetatos.</i> .....	69
<b>Figura 31.</b> Efecto de temperatura y pH para la transfructosilación, <b>A:</b> Reacciones de transfructosilación a pH 4.5 a diferentes temperaturas desde 25°C hasta 70°C, <b>B:</b> reacciones de transfructosilación a 50°C con distintos valores de pH desde 3.5 hasta 7.5. Las reacciones se llevaron por 20 min.....	70
<b>Figura 32.</b> Esquema de reacción para la transfructosilación a partir de sacarosa. (Raga-Carbajal et al., 2021).....	71
<b>Figura 33 .</b> Efecto de la temperatura en la relación hidrólisis/transfructosilación de rINU-ISO3. Las reacciones se realizaron con buffer de acetatos 50 mM a pH 5.5 con sacarosa 1500 mM con una actividad volumétrica de rINU-ISO3 de 34 U/mL, por 20 min, 450 rpm. ....	72
<b>Figura 34.</b> Efecto del pH en la relación hidrólisis/transfructosilación derINU-ISO3. Las reacciones se realizaron a 25°C con sacarosa 1500 mM con una actividad volumétrica de rINU-ISO3 de 34 U/mL, por 20 min, 450 rpm. ....	73
<b>Figura 35.</b> Amplificación de plásmido para las mutantes W50F, W50A y Q236T a distintas temperaturas; <b>MP:</b> Marcador de DNA, <b>Ref:</b> Gen INU-ISO (1700 bp), Mutantes: <b>W50F, W50A y Q236T:</b> Plásmido pPICZαB (3600 bp).....	75
<b>Figura 36.</b> Amplificación de plásmido para mutante W50A con diferentes concentraciones de DMSO y temperaturas. <b>MP:</b> Marcador de DNA, <b>W50A</b> con diferentes concentraciones de DMSO y temperaturas de amplificación.....	76
<b>Figura 37.</b> Ubicación de las mutantes adicionales que se encontraron en los plásmidos secuenciados para W50F y Q236T, <b>A:</b> Para la mutante W50F se encontraron las mutantes S131P, Y390s e I405N identificadas con color verde y rojo respectivamente, <b>B.</b> Para la mutante Q236T, se encontraron las mutantes W96R y Y99C, identificadas con color verde y rojo respectivamente. ....	77
<b>Figura 38.</b> Seguimiento de expresión de enzimas rINU-ISO3, W79A y F113A. <b>A:</b> Cantidad de proteína a través de los días de inducción con metanol; <b>B:</b> Actividad volumétrica a través de los días de inducción con metanol. ....	79
<b>Figura 39.</b> Cromatograma obtenido de la purificación del sobrenadante de la enzima W79A, en color verde se muestra el gradiente de imidazol que se usó durante la purificación, C es la proteína de interés. ....	80
<b>Figura 40.</b> Cromatograma obtenido del paso de la purificación del sobrenadante de la enzima F113A, en color verde se muestra el gradiente de Imidazol que se usó durante la purificación, C es la proteína de interés.....	81



<b>Figura 41.</b> Verificación de la purificación de enzimas. . En el carril PM se encuentra el marcador de peso molecular, carriles rINU-ISO3, W79A y F113A: Enzimas recombinantes dializadas y concentradas.....	82
<b>Figura 42.</b> TLC productos de reacción de transfructosilación para las enzimas mutantes F113A y W79A, como control se puso sacarosa, fructosa y FOS en una concentración de 1% m/v y la reacción de transfructosilación de rINU-ISO3.....	83
<b>Figura 43.</b> Cromatogramas de los productos de reacción de transfructosilación. A: Reacción con RINU-ISO3, B; Reacción con F113A, C; Reacción con W79A, D; 1-kestosa, F: Fructosa, G: Glucosa, S: Sacarosa, kestosa: 1-kestosa.....	84
<b>Figura 44.</b> Efecto de las mutaciones F113A y W79A en la reacción de transfructosilación de rINU-ISO3. Las reacciones se hicieron por triplicado bajo las mismas condiciones: 25°C, buffer de acetatos 50 mM a pH 5.5, sacarosa 1500 mM por 20 min a 450 rpm.....	85
<b>Figura A.1.</b> Curva patrón de BSA para determinar proteína por el método de Bradford... 99	
<b>Figura A.2.</b> Curva de calibración de fructosa a partir de una disolución de fructosa 1 g/ 100 mL para la determinación de azúcares reductores por el método DNS (Miller, 1959).99	
<b>Figura A. 3</b> Curvas patrón de glucosa, fructosa y sacarosa de 3 a 20 g/L para cuantificación de glucosa y fructosa libres por HPLC. ....	100
<b>Tabla 1.</b> Contenido de prebióticos de tipo fructano presentes de forma natural en alimentos. Loo et al., 1999; Moshfegh et al., 1999.....	11
<b>Tabla 2.</b> Recopilación de investigaciones utilizando oligosacáridos para confirmar su efecto prebiótico. ....	13
<b>Tabla 3.</b> Clasificación de los FOS. (Aguado, 2011; Lira León et al., 2021).....	16
<b>Tabla 4.</b> <i>Origen y tipo de actividad enzimática para GH32 y GH68</i> .....	19
<b>Tabla 5.</b> Fuentes de enzimas productoras de fructooligosacáridos(Aguado, 2011; Lira León et al., 2021; Yun, 1996) .....	24
<b>Tabla 6.</b> Microorganismos productores de inulinasas (Trapala, 2017) .....	25
<b>Tabla 7.</b> Cebadores para las mutantes F114A y W79A.....	34
<b>Tabla 8.</b> Cebadores para las mutantes W50F, W50A y Q236T .....	35
<b>Tabla 9.</b> Reactivos que se utilizaron para PCR.....	36
<b>Tabla 10.</b> Energía de unión del complejo E-S (Sacarosa-rINU-ISO3) .....	48
<b>Tabla 11.</b> Energía de unión del complejo F113A – sacarosa obtenidos de la dinámica molecular por 10 ns a 50°C a presión constante .....	54
<b>Tabla 12.</b> Energía de unión del complejo W79A- sacarosa obtenidos de la dinámica molecular por 10 ns a 50°C a presión constante .....	57
<b>Tabla 13.</b> Energía de unión del complejo W50F - sacarosa obtenidos de la dinámica molecular por 10 ns a 50°C a presión constante .....	59
<b>Tabla 14.</b> Energía de unión del complejo Q236T - sacarosa obtenidos de la dinámica molecular por 10 ns a 50°C a presión constante .....	61
<b>Tabla 15.</b> Tabla de purificación de la enzima recombinante.....	66
<b>Tabla 16.</b> Seguimiento de expresión de enzimas .....	79
<b>Tabla 17.</b> Tabla de purificación de rINU-ISO3, W79A y F113A .....	82

<b>Tabla A 1.</b> Resumen análisis estadístico ANOVA para el porcentaje de transfructosilación para rINU-ISO3 y sus mutantes .....	100
<b>Tabla A 2.</b> Prueba de Tukey para determinar diferencia significativa entre grupos.....	101

## Resumen

Los prebióticos son un grupo de nutrientes que son consumidos por la microbiota intestinal y presentan efectos benéficos en la salud humana, por ejemplo, promueven el crecimiento de especies beneficiosas como bifidobacterias y lactobacilos. Dado que estos compuestos se encuentran en bajas concentraciones en la dieta, se han buscado alternativas para producir prebióticos a mayor escala. Entre los grupos de prebióticos encontramos a los fructooligosacáridos (FOS), que son oligómeros de fructanos que se pueden obtener a través de la hidrólisis de la inulina o mediante síntesis enzimática. Enzimas como las inulinasas (EC 3.2.1.80) han demostrado que, además de hidrolizar la inulina tienen la capacidad de realizar la reacción inversa, la síntesis de fructooligosacáridos (FOS) a partir de la sacarosa.

Las inulinasas son grupo de enzimas pertenecen a la familia 32 de las glicosíl-hidrolasas (GH32). Estas enzimas comparten una estructura tridimensional que está conformada por dos dominios, el N-terminal constituido por cinco hebras  $\beta$  que forman una estructura tipo propela donde se encuentra el sitio activo, y el dominio C-terminal consistente en una estructura tipo sándwich  $\beta$ .

El análisis estructural de las glicosíl-hidrolasas ha permitido obtener información relevante sobre su conformación, identidad y el papel que juegan los residuos aledaños a los catalíticos en el reconocimiento molecular y la catálisis. Estos reportes se han enfocado en enzimas provenientes de hongos filamentosos y plantas, en donde se estudia cuál es papel que juegan algunos aminoácidos cercanos a la triada catalítica y si existe algún cambio al ser modificados.

En este proyecto se estudió el efecto de algunas mutaciones cercanas a los aminoácidos del sitio activo de una inulinasa recombinante (rINU-ISO3) sobre la actividad en la reacción de transfructosilación de la sacarosa. Para cumplir el objetivo, se compararon los aminoácidos cercanos a la triada catalítica en diferentes enzimas como las fructosiltransferasas y las invertasas, cuya función es sintetizar FOS y reconocer a la sacarosa respectivamente. Posteriormente, se llevaron a cabo

mutaciones en la inulinasa rINU-ISO3 que pudieran modificar la actividad hacia la transfructosilación.

La inulinasa rINU-ISO3 demostró tener actividad de transfructosilación con una actividad volumétrica de 34 U /mL a T 25° C, pH 5.5 con 1500 mM de sacarosa, de acuerdo a los resultados cuantitativos la relación hidrólisis/transfructosilación, el porcentaje de transfructosilación que mostró la inulinasa fue de 11.18% mientras que las mutantes W79A y F113A con las mismas condiciones de reacción mejoraron el porcentaje de transfructosilación a 12.16% y 18.5%. Para la mutante W79A los resultados de transfructosilación no mostraron una diferencia significativa estadísticamente, sin embargo con los estudios *in silico* se demostró que la actividad enzimática se afectó de forma negativa al modificar el triptófano por alanina porque el triptófano funciona como una especie de tapa que permite que la sacarosa se conserve en el sitio catalítico, por otro lado para la mutante F113A la actividad de transfructosilación muestra una diferencia significativa, es decir se favorece la producción de FOS de grado de polimerización 3 (DP3) principalmente.

## I. Marco teórico

### II.1 Prebióticos

El concepto de prebiótico fue introducido por Gibson y Roberfroid en 1995 como “ingredientes que no son hidrolizados por las enzimas intestinales y que confieren un efecto positivo para la salud al estimular selectivamente el crecimiento o el metabolismo de microorganismos de acción beneficiosa en el colon”. En 2016, la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP, por sus siglas en inglés), consensó la definición científica actual de prebiótico. Este concepto dice que un prebiótico es: “un sustrato que se utiliza selectivamente por los microorganismos del huésped y que confiere un beneficio para la salud del mismo” (ISAPP, 2017; Corzo, 2015; Gibson & Roberfroid, 1995).

Los prebióticos pueden estar presentes de forma natural en alimentos como hortalizas, verduras, frutas, cereales y legumbres, por mencionar algunos, sin embargo, se encuentran en bajas concentraciones (**Tabla 1**) comparado con los requerimientos del organismo humano (4 a 20 g/día)

**Tabla 1.** Contenido de prebióticos de tipo fructano presentes de forma natural en alimentos. Loo et al., 1999; Moshfegh et al., 1999.

Alimento	Inulina (g/100 g)	Fructooligosacáridos (g/100 g)
Cebolla (cruda)	1.1-7.5	1.1-7.5
Cebolla (cruda-seca)	4.7-31.9	4.7-31.9
Cebolla (cocida)	0.8-5.3	0.8-5.3
Achicoria de Jersusalem	16-20	10-15
Raíz de achicoria	35.7-47.6	19.6-26.2
Porro o cebolla larga (cruda)	3.0-10.0	2.4-8.0
Ajo (crudo)	9.0-16.0	3.6-6.4

<b>Ajo (seco)</b>	20.3-36.1	8.1-14.5
<b>Plátano</b>	0.3-0.7	0.3-0.7
<b>Plátano (seco)</b>	0.9-2.0	0.9-2.0
<b>Centeno (horneado)</b>	0.5-0.1	0.5-0.1
<b>Cebada (cruda)</b>	0.5-1.5	0.5-1.5
<b>Cebada (cocinada)</b>	0.1-0.2	0.1-0.2
<b>Yacon</b>	3-19	3-19
<b>Trigo (salvado- crudo)</b>	1.0-4.0	1.0-4.0
<b>Trigo (al horno con harina)</b>	1.0-3.8	1.0-3.8
<b>Trigo (hervido con harina)</b>	0.2-0.6	0.2-0.6
<b>Espárrago (seco)</b>	2-0-3.0	2 -3
<b>Espárrago (hervido)</b>	1.4 -2.0	1.4- 2.0

Para que un compuesto sea clasificado como prebiótico debe cumplir ciertos criterios; 1) no debe hidrolizarse ni absorberse en la parte superior del tracto gastrointestinal; 2) debe ser un sustrato selectivo para una o un número limitado de bacterias beneficiosas del colon, estimular su crecimiento y/o activar el metabolismo de las mismas; 3) debe mantener el equilibrio de la microbiota en favor de una mejor composición; 4) tener la capacidad de mejorar la viabilidad y/o actividad del microbiota intestinal (Gibson & Roberfroid, 1995).

Existen muchos compuestos con actividad prebiótica, pero se necesitan diversos ensayos independientes en humanos y cumplir las cuatro propiedades para su categorización definitiva como prebiótico. Dentro de estos compuestos se destacan los manano-oligosacáridos, pectín-oligosacáridos, gluco-oligosacáridos,

oligosacáridos de soja (SOS), isomalto-oligosacáridos (IMO), xilooligosacáridos (XOS), entre otros.

Roberfroid y colaboradores (1995) identificaron principalmente tres grupos de compuestos nutricionales confirmados como prebióticos (**Tabla 2**), el primer grupo engloba a los prebióticos de tipo inulina; que son la inulina y los fructooligosacáridos (FOS) (enlaces  $\beta$ -(2-1), el segundo grupo son los galactooligosacáridos (GOS) (enlaces  $\beta$ -(1-3),  $\beta$ -(1-4) y  $\beta$ -(1-6) y por último la lactulosa (4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-fructosa) (**Figura 1**). Los primeros además de formar parte de los carbohidratos llamados fructanos también representan el grupo de prebióticos más comercializados y utilizados como ingredientes en alimentos funcionales como bebidas, pasteles, helados y galletas, además de utilizarse como suplementos nutricionales, mientras que los GOS se utilizan como ingrediente en las fórmulas infantiles. Por otro lado, la lactulosa es un disacárido sintético que se ha utilizado como aditivo en fórmulas infantiles para estimular los lactobacilos. (Gibson & Roberfroid, 1995; Gibson, *et al.*, 2010; Aguado, 2011; Lira León *et al.*, 2021)

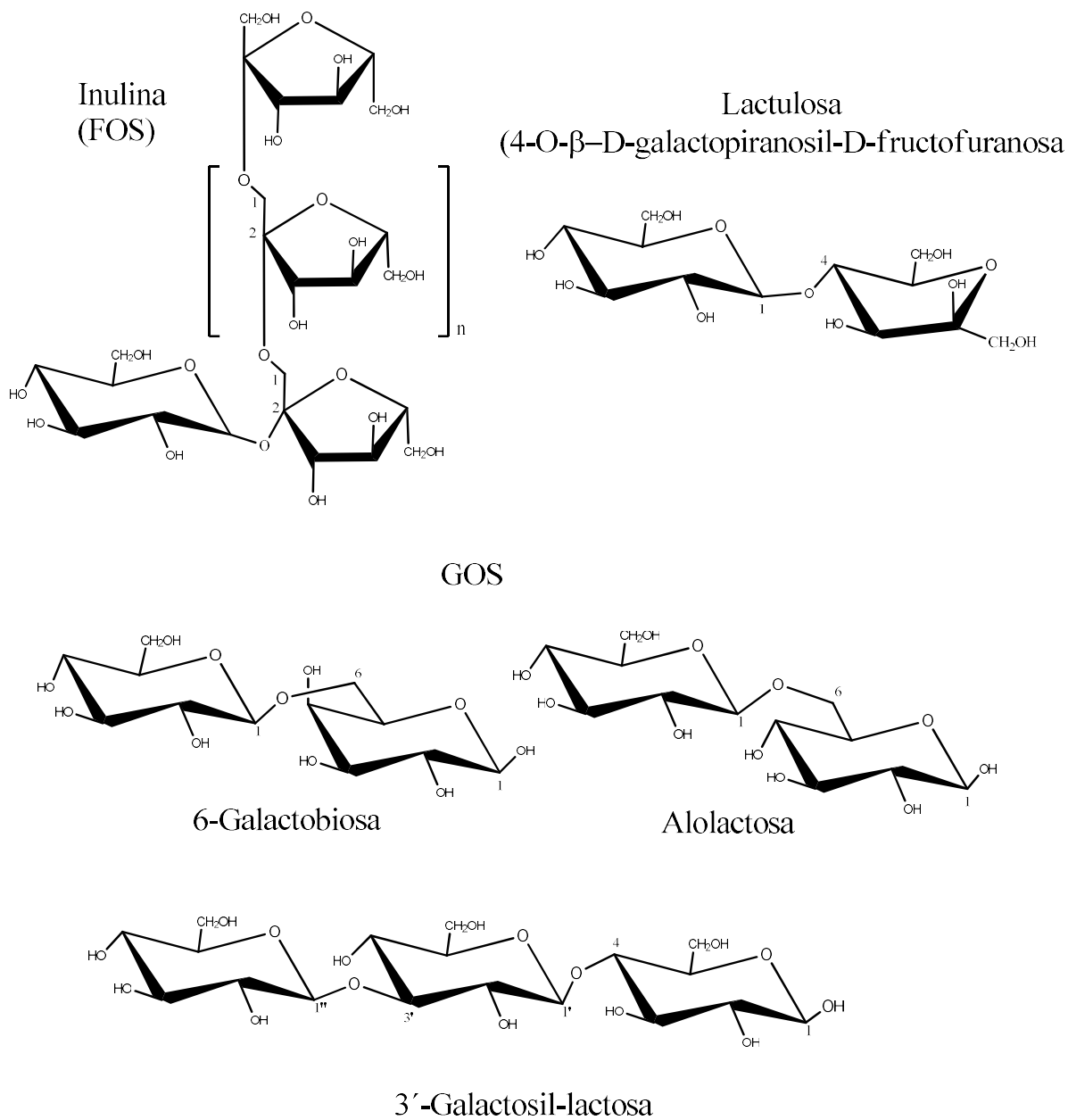
**Tabla 2.** Recopilación de investigaciones utilizando oligosacáridos para confirmar su efecto prebiótico.

Sujetos de estudio	Prebiótico	Dosis	Duración	Resultados	Referencias
23	FOS de cadena corta	8 g/día	14 días	Incremento significativo de bifidobacterias	Hidaka <i>et al.</i> 1986
23	FOS de cadena corta	8 g/día	2 semanas	Incremento de bifidobacterias fecales aproximadamente 10 veces	Mitsouka <i>et al.</i> 1987
10	FOS de cadena corta	4g/día	14 días	Incremento de bifidobacterias y lactobacilos	Williams <i>et al.</i> 1994
8	Oligofruktosa e inulina	15 g/día	15 días	Aumento significativo de bifidobacterias y reducción de	Gibson <i>et al.</i> 1995

				bacteroides, clostridios y fusobacterias	
<b>10</b>	Inulina	20g/día y 40g/día	8 días, y 11 días	Incremento de bifidobacteria para 40g/día, reducción de eterococos, bacteroides y enterobacterias.	Kleessen <i>et al.</i> 1997
<b>14</b>	Inulina	9g/día	2 semanas	Incremento en bifidobacterias	Harmsen <i>et al.</i> 2002
<b>12</b>	GOS	15g/día	6 días	Incremento en bifidobacterias y lactobacilos, reducción de bacteroides	Ito <i>et al.</i> 1993
<b>5</b>	GOS	3g/día y 10g/día	1 semana y 1 semana	3g/día efectos mínimos. 10g/día un aumento en bifidobacterias y lactobacilos y una reducción de bacteroides	Tamaka <i>et al.</i> 1983
<b>30</b>	GOS	7.5g y 15g/día	7 días	Incremento selectivo en bifidobacterias	Depeint <i>et al.</i> 2008
<b>12</b>	Lactulosa	3g/día	14 días	Incremento en el recuento total de bacterias de ácido láctico, no hubo cambios en las bifidobacterias.	Teuri <i>et al.</i> 1998
<b>65</b>	Lactulosa	20g/día	7 días	Incremento en bifidobacterias fecales y la actividad b-galactosidasa	Bouhnik <i>et al.</i> 2004



## PREBIÓTICOS

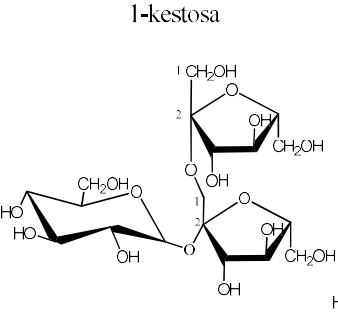
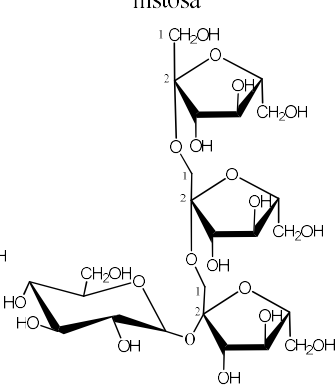
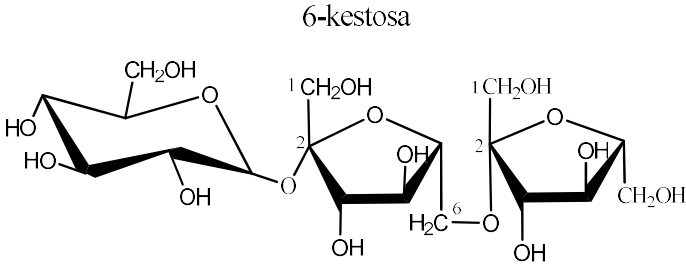
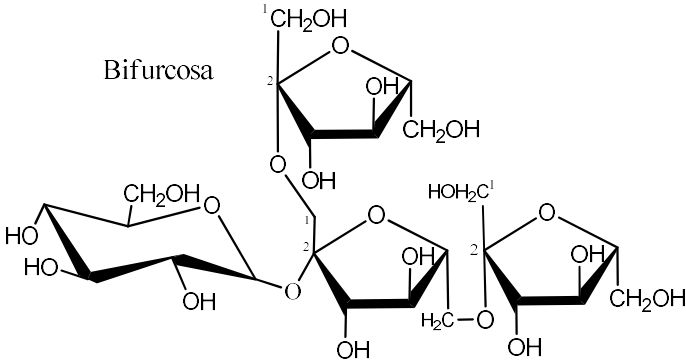


**Figura 1.** Ejemplos de estructuras de prebióticos (González Díaz et al., 2020; Rentschler et al., 2015)

## II.2 Fructooligosacáridos (FOS)

Los fructooligosacáridos (FOS) son compuestos de cadenas cortas de 3 a 8 moléculas de fructosa unidas por enlaces  $\beta$ -glicosídicos  $\beta$ -(2,1) o  $\beta$ -(2,6) o bien  $\beta$ -(2,1) y  $\beta$ -(2,6), con una molécula de glucosa en su extremo reductor (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Clasificación de los FOS. (Aguado, 2011; Lira León et al., 2021)

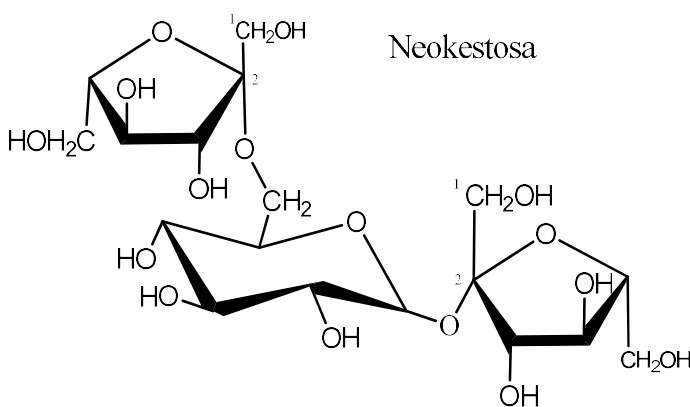
Clasificación FOS	Ejemplos	Características
<b>Tipo inulina</b>	<p>1-kestosa</p>  <p>nistosa</p> 	<p>Estructura <math>\beta</math></p> <p>2<math>\rightarrow</math>1</p> <p><math>\beta</math>-D-</p> <p>Fructofuranosil-</p> <p>(2<math>\rightarrow</math>1)-<math>\beta</math>-</p> <p>DFructofuranosil-</p> <p>(2<math>\rightarrow</math>1)- <math>\alpha</math>-D-</p> <p>Glucopiranosido.</p>
<b>Tipo levano</b>	<p>6-kestosa</p> 	<p>Enlaces <math>\beta</math> 2<math>\rightarrow</math>6</p> <p><math>\beta</math>-D-</p> <p>Fructofuranosil-</p> <p>(2<math>\rightarrow</math>6)-<math>\beta</math>-</p> <p>DFructofuranosil-</p> <p>(2<math>\rightarrow</math>1)- <math>\alpha</math>-D-</p> <p>Glucopiranosido.</p>
<b>Tipo levano mixto</b>	<p>Bifurcose</p> 	<p>Enlaces <math>\beta</math> 2<math>\rightarrow</math>1</p> <p>Y <math>\beta</math> 2<math>\rightarrow</math>6</p> <p><math>\beta</math>-D-</p> <p>Fructofuranosil-</p> <p>(2<math>\rightarrow</math>1)-o-[<math>\beta</math>-</p> <p>DFructofuranosil-</p> <p>(2<math>\rightarrow</math>6)]- <math>\beta</math>-D-</p>

---

Fructofuranosil-  
 $\alpha$ D-  
Glucopiranosido.  
Se unen en 2  
unidades en la  
fructosa de la  
sacarosa

---

Enlaces  $\beta$  2 $\rightarrow$ 1  
Y  $\beta$  2 $\rightarrow$ 6  
 $\beta$ -D-



Fructofuranosil-  
(2 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -  
DGlucopiranosil-  
(1 $\leftrightarrow$ 2)- $\beta$ D-  
Fructofuranosido  
Se une en el C6  
de la glucosa de  
la sacarosa.

---

Estos compuestos se obtienen mediante hidrólisis química o enzimática de la inulina o bien por la síntesis enzimática utilizando invertasas o fructosil-transferasas a partir de sacarosa.

La hidrólisis química para obtener FOS es la más común debido a que es más económica, sin embargo, es poco eficiente e inespecífica. En este proceso se calienta una disolución de inulina 5% m/v en agua destilada con una solución de ácido clorhídrico o sulfúrico al 10% v/v en un rango de pH 1.5 a 3.75, entre 75 y 96°C en un intervalo de 5 a 25 min, para después neutralizarla con bicarbonato de sodio. Una vez que se neutraliza se lleva a cabo una precipitación fraccionada con etanol para obtener los FOS, pero no se logra controlar su tamaño además de que se generan compuestos tóxicos como el hidroximetilfurfural (HMF) y furfural, que

han demostrado ser genotóxicos y mutagénicos. (Farag et al., 2020; Fontana, J & Tiboni, M, 2011; Sandoval & Milagros, 2017; Trapala et al., 2020)

Una alternativa para obtener FOS es a partir de la sacarosa, mediante el uso de enzimas con actividad transferasa o bien mediante el uso de inulinasas, cuya actividad principal es la hidrólisis, siempre y cuando se modifiquen las condiciones de reacción. Ambos tipos de enzimas se pueden obtener de plantas, bacterias y hongos. A pesar de que la síntesis enzimática es más costosa, las condiciones de reacción que requiere son más suaves (50°C, pH 5) y es sustentable con el medio ambiente. (Goosen et al., 2007).

En 2007 Santos y Maugeri llevaron a cabo la producción de FOS con una inulinasa de *K. marxianus* var. *bulgaricus* y determinaron que las mejores condiciones para la obtención de FOS son T 50°C pH 6.0 y una concentración de 1300 mM de sacarosa. Por otro lado, en 2011 Risso y colaboradores encontraron que para una inulinasa de *K. marxianus* NRRL Y-7571 que fue inmovilizada las mejores condiciones de reacción para producción de FOS fueron a 40°C, pH 5.0 y una concentración de 1800 mM de sacarosa como sustrato. Posteriormente en el 2012 el mismo grupo realizó las reacciones de transfructosilación en un sistema con solventes orgánicos (acetato de butilo/agua en una proporción 25/100) y las condiciones de reacción fueron a 40°C, pH 5.0 y una concentración de 1600 mM de sacarosa (Risso et al., 2012b, 2012a, 2012b; Santos, 2007)

Para levansacarosas de *Bacillus amyloliquefaciens*, las condiciones de temperatura para favorecer la producción de FOS se encuentra en un rango de 15 a 30°C, en 2011 el grupo de Tian Feng encontraron que la actividad de transfructosilación era favorecida a temperaturas bajas mientras que para la hidrólisis la temperatura óptima ronda entre 45 y 50°C. De igual manera en el 2022 Choukade y Naveen determinaron que las condiciones óptimas de reacción de transfructosilación para una fructosiltransferasa de *Aspergillus tamarri* son de 28.4°C a pH 7 y con una concentración de 1500 mM de sacarosa(Choukade & Kango, 2022; Tian et al., 2011)

### II.3 Familia GH32 y GH68 de glico-hidrolasas

Las familias GH32 y GH68 de las glicosil hidrolasas se agrupan en el clan GH-J (**Tabla 4**) y comparten un plegamiento común de cinco hojas beta que forman una  $\beta$  propela, a pesar de la baja identidad de secuencia (<15%).

La familia GH32 es un grupo extendido de enzimas que son similares a nivel estructural, pero con funciones distintas como las que hidrolizan el enlace glicosídico  $\beta$ -(2,6) y/o  $\beta$ -(2,1) entre dos o más carbohidratos, (incluye a más de 370 enzimas de origen vegetal, fúngico y bacteriano) o las que sintetizan fructanos como las fructosiltransferasas.

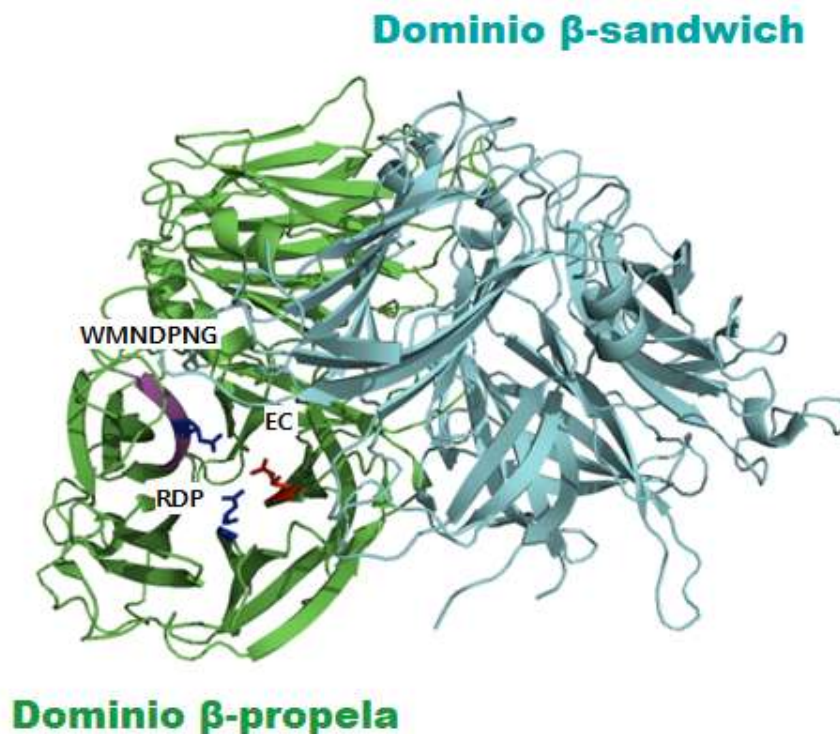
Gracias a las estructuras tridimensionales que se conocen hasta ahora de enzimas vegetales que pertenecen a la familia GH32 se sabe que son capaces de diferir en la especificidad del sustrato y pueden hidrolizar tanto a los fructanos como a la sacarosa. Dentro de esta familia se encuentran las invertasas (EC 3.2.1.26), las inulinasas (EC 3.2.1.7), las levanasas (EC 3.2.1.65), las 2,6- $\beta$ -fructano 6-levanbiohidrolasas (EC 3.2.1.64), las fructano  $\beta$  - (2,1)- fructosidasas / 1-exohidrolasa (EC 3.2.1.153) y las transfructosidasas sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasas (EC 2.4.1.99), fructano: fructano 1-fructosiltransferasa (EC 2.4.1.100) (Alberto et al., 2004; Van den Ende et al., 2009; Guevara Domínguez Paulina, 2017).

**Tabla 4.** Origen y tipo de actividad enzimática para GH32 y GH68

Familia	Origen	Tipo de actividad enzimática
GH32	Plantas	Invertasa Exo-fructanohidrolasa Fructosiltransferasa
	Levaduras y Hongos	Invertasa Exo-fructanohidrolasa Endo-fructanohidrolasa Fructosiltransferasa
	Bacterias	B-fructosidasa
GH68	Bacterias	Fructosiltransferasas <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inulosacarasa</li> <li>• Levansacarasa</li> </ul>

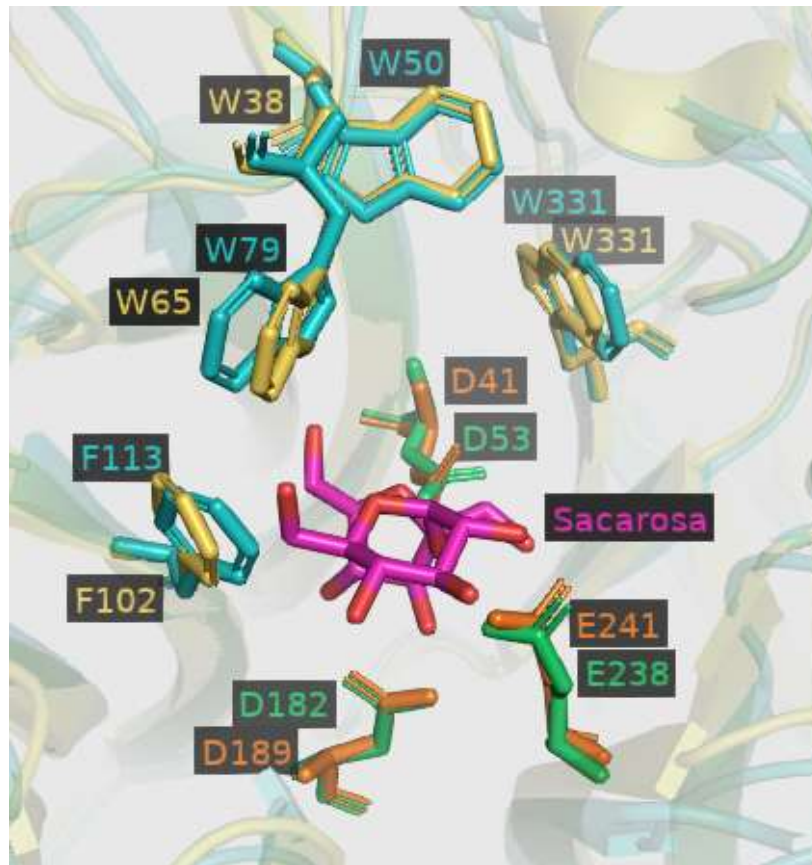
La estructura tridimensional de las enzimas de la familia GH32 se organiza principalmente en dos dominios, 1) el primer dominio se encuentra en el extremo amino terminal, constituido por cinco hojas  $\beta$  donde cada una consta de cuatro hebras antiparalelas con una topología "W", que forman una  $\beta$ -propela donde se encuentra la cavidad del sitio catalítico, 2) el segundo dominio se encuentra en el carboxilo terminal y se denomina  $\beta$ -sándwich que está formado por dos hojas  $\beta$  de seis hebras antiparalelas. (**Figura 2**).

Dentro del sitio activo se encuentran tres motivos conservados. El primero es el WMNDPNG, donde el ácido aspártico tiene la función de nucleófilo en la reacción de hidrólisis. El segundo está compuesto por los residuos de aminoácidos RDP, este motivo, al igual que el primero cuenta con un ácido aspártico, que se encarga de estabilizar el estado de transición durante la reacción. Por último, el tercer motivo está formado por dos residuos EC, aquí el ácido glutámico, se encarga de donar los protones en la catálisis, siendo uno de los papeles más importantes.



**Figura 2.** Estructura de una exo-inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* (PDB 6J0T) perteneciente a familia GH32 y los motivos conservados, donde se encuentra la triada catalítica marcados de colores morado, azul y rojo.

Altenbach, y colaboradores en el 2009, demostraron que en la familia GH32 se encuentra además, una zona aromática denominada “bolsillo hidrofóbico” () constituido por 4 motivos conservados **WMNDPNG**, **FSGSAT/WSGSAT**, **WGN** y **WS/GY** donde los aminoácidos aromáticos en su mayoría triptófanos parecen ser importantes para la unión óptima y estable de la sacarosa (Altenbach *et al.*, 2009).



**Figura 3.** Aminoácidos que forman el bolsillo hidrofóbico en amarillo y verde agua, y la triada catalítica en anaranjado y verde de exo-inulinasa de *A. awamori* (PDB 1Y4W) y exo-inulinasa de *K. marxianus* (PDB 6J0T) respectivamente.

En el 2009 Van den Ende y colaboradores realizaron múltiples alineamientos con enzimas fructoexohidrolasas (FEH) e invertasas provenientes de plantas como *Arabidopsis thaliana*, *Cichorium intybus*, *Triticum aestivum*, *Nicotina tabacum*, entre otras (**Figura 4**. Alineamientos de enzimas fructoexohidrolasas (FEH) e invertasas provenientes de distintas plantas (Van den Ende *et al.*, 2009).**Figura 4**). Encontraron que tanto las invertasas como las FEH contienen ocho motivos

conservados en la región del sitio activo y cuatro de ellos pertenecen al “bolsillo hidrofóbico”, que Altenbach D y colaboradores, demostraron un año antes. Además Van den Ende y colaboradores encontraron una zona variable cerca del motivo catalítico ácido/base (EC), que por un lado las invertasas muestran una pareja D/L o D/R mientras que en las FEH se observan aminoácidos alternativos o deleciones en esta área (**Figura 5**) (Van den Ende et al., 2009).

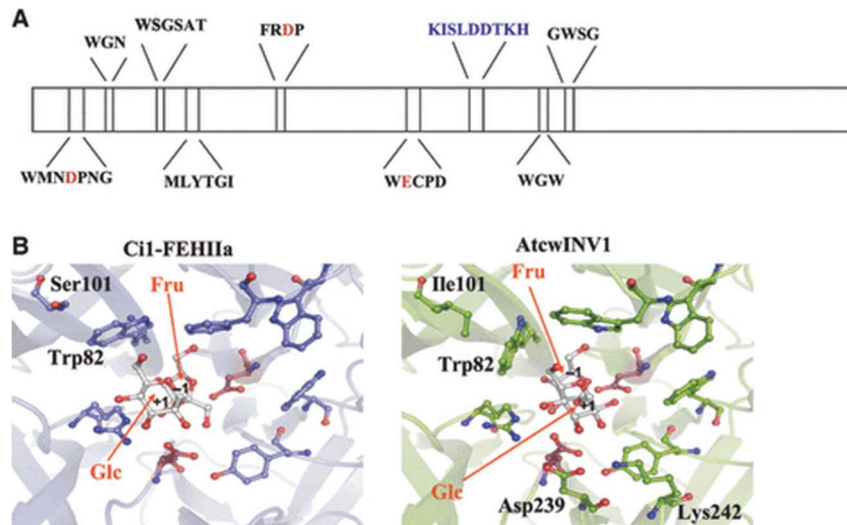
A	↓ ↓
6-FEH <i>Arabidopsis.thaliana</i> *	HVLKVSLEIETLHDYYTIGSYDREKDVY
6-FEH <i>Beta vulgaris</i> *	HVLKLSLFD <del>T</del> QY <del>E</del> YYTIGRYDIEKDIY
1-FEHI <i>Cichorium intybus</i> *	HVLKVSFN <del>S</del> --REYYVIGTYDPIKDKF
1-FEHIa <i>Cichorium intybus</i> *	HVMKAGFEG--HDWYTIGTYS <del>P</del> DRENF
1-FEHIb <i>Cichorium intybus</i> *	HVMKAGFEG--HDWYTIGTYS <del>P</del> DRENF
1-FEH <i>Campanula.rapunculoides</i> *	HVVKVGFN <del>G</del> --IDWYTIGT <del>L</del> S--ERDNY
6&1-FEH <i>Arabidopsis thaliana</i> *	HVLKASFG <del>G</del> --NDCYVIGKYSSETEDF
1-FEHw1 <i>Triticum aestivum</i> *	HALKMSVDS--VDKYMIGVYDLQRDAF
1-FEHw2 <i>Triticum aestivum</i> *	HALKMSVDS--VDKYMIGVYDLQRDAF
6&1-FEH <i>Triticum aestivum</i> *	HVLKMSIN <del>S</del> --CDMYIVGVYDLKRDEF
1-FEH <i>Hordeum vulgare</i>	HALKMSVDS--VDKYMIGVYDLQRDAF
6-KEHw1 <i>Triticum aestivum</i> *	HVLKMG <del>M</del> NF--GEDVYVIGVYDLKRDAF
6-KEHw2 <i>Triticum aestivum</i> *	HVLKMG <del>L</del> NF--GEDVYVIGVYDLKRDAF
1-FEH <i>Lolium perenne</i> *	HVLKMSLD <del>S</del> --CDKYMIGVYDLKSDTF
6-FEH <i>Triticum aestivum</i> *	HVLKLSVMNT <del>T</del> QDY <del>Y</del> AVGRYDDVADTF

B	239 242
CWINV1 <i>Arabidopsis.thaliana</i> *	HVLKISLDDTKHDYYTIGTYDRVKDKF
CWINV1 <i>Solanum tuberosum</i>	HVLKVSFDVTRFDHYTIGTYDTKKDKY
CWINV <i>Nicotiana tabacum</i> *	HVLKVS <del>L</del> DVTRFEYYTVGTYDTRKKDRY
CWINV2 <i>Solanum tuberosum</i>	HVLKNSMDL <del>T</del> RFEYYTLGKYDTKKDRY
CWINV3 <i>Solanum tuberosum</i>	HVLKNSL <del>D</del> VNRFEYYTIGMYDTKKDRY
CWINV5 <i>Lycopersicon esculentum</i> *	IVLKNSL <del>D</del> VARFDYYTIGMYHTKIDRY
CWINV <i>Vicia faba</i>	HVLKNSL <del>D</del> ITRYEYYTIGYYLQNDKY
CWINV <i>Pisum sativum</i>	HVLKVS <del>L</del> DDTKHDHYLIGSYDVVKDVF
CWINV2 <i>Vicia faba</i>	HVLKVS <del>L</del> DDKKHDYYLIGSYDEEKDRF
CWINV <i>Chenopodium rubrum</i> *	HVLKVS <del>L</del> DVSKHDVYTI <del>G</del> GGYDTKKDAY
CWINV2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	HVLKVS <del>L</del> DLTRYEYYTLGTYDTKKDRY
CWINV4 <i>Arabidopsis thaliana</i>	HVLKVS <del>L</del> DITRYEYYTLGKYDLKKDRY
CWINV1 <i>Daucus carota</i> *	HVLKVS <del>L</del> DLTRYEYYTVGTYLTDKDRY
CWINV <i>Oryza sativa</i>	YVLKNSL <del>L</del> DLTRYDYTVGIY <del>N</del> KVTERY
CWINV <i>Triticum.aestivum</i>	YVLKVS <del>L</del> DVTRYEYYTIGWYDHAKDRY
CWINV1 <i>Zea mays</i>	YVLKSS <del>L</del> DLTRYDYTTIGSYDGGKDRY
CWINV3 <i>Zea mays</i>	YVLKVS <del>L</del> DLTRYEYYTVGTYDHATDRY
CWINV2 <i>Zea.mays</i>	HVLKNSL <del>D</del> LRRYDYTVGTYHPRAERY
CWINV5 <i>Arabidopsis.thaliana</i>	HVLKVS <del>L</del> TDTFN <del>D</del> YYTIGTYDEV <del>R</del> DVY

**Figura 4.** Alineamientos de enzimas fructoexohidrolasas (FEH) e invertasas provenientes de distintas plantas (Van den Ende et al., 2009).





**Figura 5.** Bolsillo hidrofóbico y zona variable cerca del motivo catalítico ácido/base (EC) de la fructoexohidrolasa e invertasa, de *Cichorium intybus* y *Arabidopsis thaliana* respectivamente (Tomado de Van den Ende et al., 2009). **A:** Los aminoácidos que pertenecen a la tríada catalítica se muestran en rojo y la zona variable se muestra en azul. **B:** Comparación de los sitios activos y la zona variable de fructoexohidrolasa de *Cichorium intybus* y una invertasa de *Arabidopsis thaliana*, ambos en complejo con sacarosa.

### Fructosiltransferasas

La síntesis enzimática de FOS se lleva a cabo empleando enzimas con alta actividad de transfructosilación, que se obtienen de diversas fuentes bacterianas, fúngicas y plantas (**Tabla 5**). Estas enzimas son capaces de unir moléculas de fructosa con enlaces  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1),  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 6), o ambos. De acuerdo a la especificidad de la enzima, la mezcla resultante posee una fórmula general  $GF_n$  donde G es la unidad de glucosa, F unidad de fructosa y n es el número de unidades de fructosa con un grado de polimerización entre 3 y 6. Su actividad depende en gran medida del sitio activo y las condiciones de reacción en las que actúan que pueden ir desde 50 a 75°C y pH 5.5 a 7.5 (Aguado, 2011; Lobato et al., 2007; Navarro et al., 2012; Sonia et al., 1998).

**Tabla 5.** Fuentes de enzimas productoras de fructooligosacáridos(Aguado, 2011; Lira León et al., 2021; Yun, 1996)

Hongos	Plantas	Bacterias
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Agave americana</i>	<i>Arthrobacter sps</i>
<i>Aureobasidium sp.</i>	<i>Agave tequilana</i>	<i>Bacillus macerans EG-6</i>
<i>Aspergillus japonicus</i>	<i>Agave vera cruze</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Allium cepa</i>	<i>Zymomonas mobilis</i>
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Asparagus officinalis</i>	
<i>Aspergillus phoenics</i>	<i>Cichorium intybus</i>	
<i>Aspergillus sydowi</i>	<i>Crinum longifolium</i>	
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Cynara scolymus</i>	
<i>Penicillium frequentans</i>	<i>Festuca arundinacea</i>	
<i>Penicillium spinulosum</i>	<i>Helianthus tuberosus</i>	
<i>Penicillium citricum</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	
<i>Penicillium purpurogenum</i>	<i>Lactuca sativa</i>	
<i>Phytophthora parasítica</i>	<i>Lolium perenne</i>	
<i>Rhodotorula sp.</i>	<i>Lycoris radiata</i>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Taraxacum officinale</i>	
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>		
<i>Sporutrichum thermophile</i>		
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>		

## Inulinasas

Otro método de obtención de FOS es mediante hidrólisis enzimática empleando inulinasas. Estas enzimas son capaces de hidrolizar el enlace  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) de la inulina, dando lugar a mezclas de fructanos con estructuras GF<sub>n</sub> y FF<sub>n</sub>, estos polímeros suelen ser lineales y las unidades de fructosa están unidas por enlace  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) (Ávila, et al., 2011; Lira León 2021).

Existen diversos organismos productores de inulinasas como plantas, bacterias, levaduras y hongos. Las inulinasas de plantas se han identificado y caracterizado a

partir de extractos de tejidos de plantas que almacenan inulina, como la achicoria, el agave y la alcachofa, sin embargo, estas enzimas tienen la desventaja de ser menos eficientes que las de origen microbiano que se pueden cultivar fácilmente y tienen un ciclo de vida más corto. (Claessens, *et al.*, 1990).

Los organismos de mayor interés para la producción de estas enzimas son los hongos filamentosos y las levaduras (**Tabla 6**) ya que se ha observado que tienen mayor eficiencia catalítica y resistencia a temperaturas mayores a los 50°C, características deseables para procesos industriales.

**Tabla 6.** *Microorganismos productores de inulinasas* (Trapala, 2017)

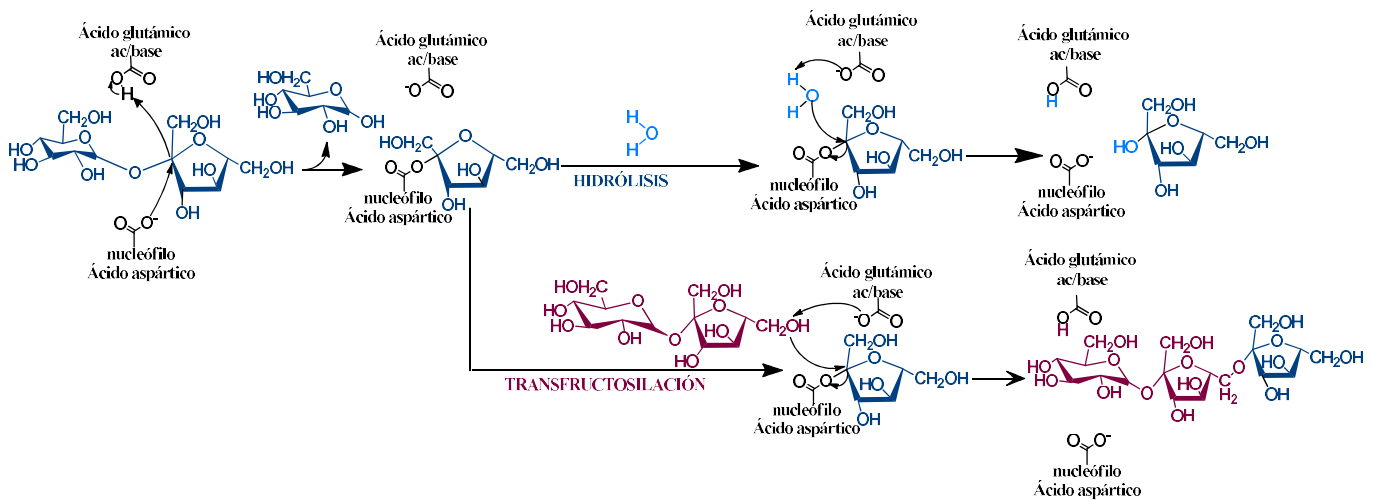
Microorganismo	Condiciones óptimas de temperatura	Condiciones óptimas de pH	Actividad enzimática	Referencia
<i>Aspergillus niger</i>	50 °C	5.0	55 U/mL (Extracto crudo)	(Kango, 2008)
<i>Penicillium sp</i> Extracto de levadura	50 °C	5.2	10 U/mL (Extracto crudo)	(Nakamura et al., 1997)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	50°C	4.8	39 U/mL (Extracto crudo)	(Golunski et al., 2011)
<i>Pichia guilliermondii</i>	60°C	6	60 U/mL (Extracto crudo)	(Gong et al., 2007)
<i>Cryptococcus aureus</i> G7	50 °C	5	85 U/mL (Extracto crudo)	(Sheng et al., 2007)

#### Mecanismo de reacción de enzimas transfructosilantes e hidrolíticas.

La reacción de transfructosilación y de hidrólisis del enlace glicosídico, son reacciones con un mecanismo catalítico muy similar, tanto que pueden ser catalizadas por una misma enzima.

La sacarosa es el sustrato que se puede emplear tanto como donante para la hidrólisis o como aceptor en la transfructosilación, para producir fructosa y 1-kestosa para la hidrólisis y la transfructosilación respectivamente.

En el primer paso se lleva a cabo un ataque nucleofílico sobre el carbono anomérico del grupo fructosilo por el carboxilo del nucleófilo (ácido aspártico), para formar un intermediario covalente enzima-fructosa, el ácido glutámico actúa como ácido donando un protón al grupo glicosilo para liberar la glucosa. En un segundo paso el ácido glutámico actúa como base aceptando un protón de la molécula donadora, en el caso de la hidrólisis la molécula donadora es el agua, mientras que en la transfructosilación puede ser otra molécula de sacarosa o un fructooligosacárido. Dependiendo de la molécula aceptora y del grupo hidroxilo que se desprotona se pueden formar diferentes compuestos (**Figura 6**) (Jitonnom et al., 2018).



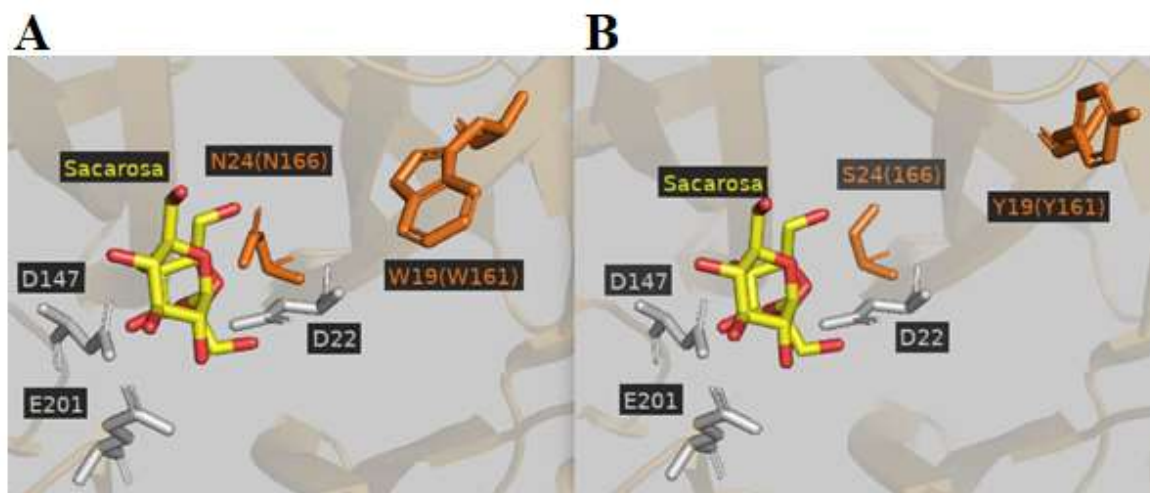
**Figura 6.** Mecanismo catalítico de enzimas transfructosilantes e hidrolíticas propuesto por Jitrayut Jitonnom. Es un mecanismo de 2 pasos un ataque nucleofílico realizado por el ácido aspártico y una deprotonación del grupo donador dependiendo de la reacción (agua o sacarosa)

## Aplicación de mutagénesis de sitio dirigido en enzimas de la familia GH32.

Las enzimas de la familia GH32 son muy similares a nivel molecular y estructural, sin embargo, son funcionalmente diferentes, por lo que se han realizado diversos estudios para comprender la base de la diversidad funcional en esta familia y conocer las características que favorecen la síntesis de algunos oligosacáridos como los FOS.

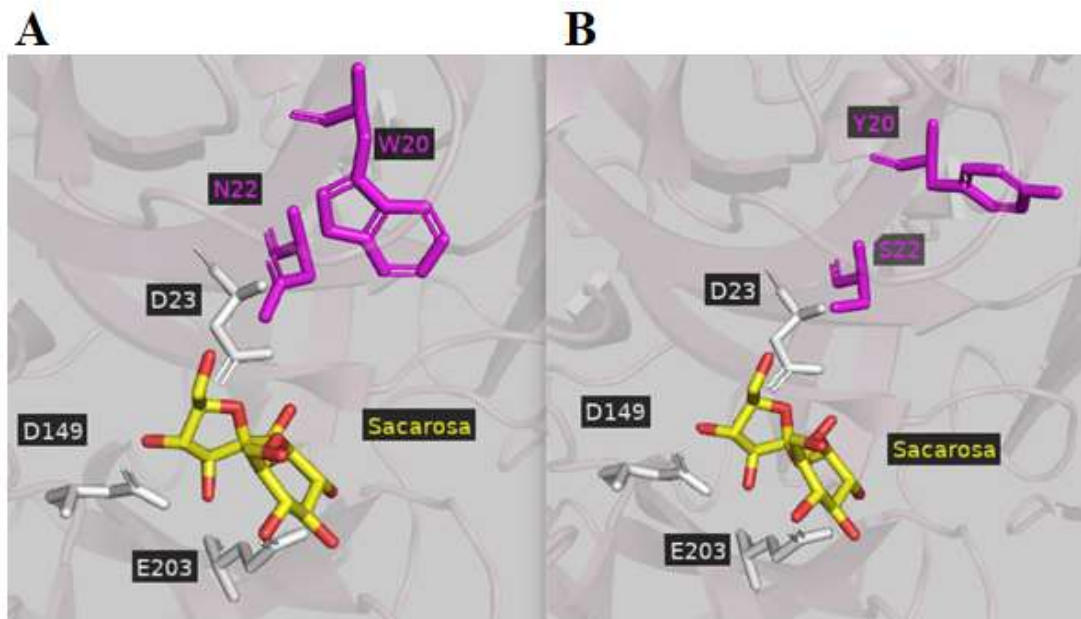
Por ejemplo, Ritsema y colaboradores (Ritsema *et al.*, 2006) reportaron la naturaleza de los cambios de aminoácidos que pueden convertir una invertasa de cebolla madura en una enzima transfructosilante, a través de la sustitución de una secuencia de 33 aminoácidos presentes en la región N-terminal (aminoácidos 143-175) por la región correspondiente de una fructano: fructano 6G-fructosiltransferasa, favoreciendo la actividad de transfructosilación un par de veces.

Posteriormente al modificar aminoácidos individuales concluyeron que las mutaciones en los aminoácidos W161Y y N166S pueden mejorar la capacidad de transfructosilación hasta cuatro veces más que la enzima silvestre (**Figura 7**).



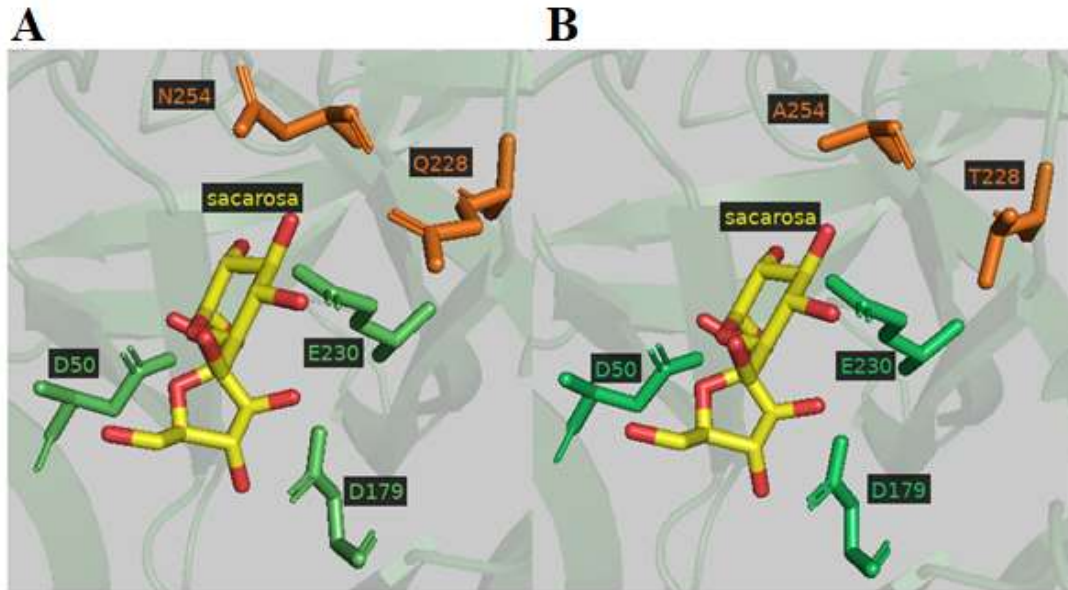
**Figura 7.** Aminoácidos de la tríada catalítica en gris y aminoácidos modificados en anaranjado en una fructosilexohidrolasa de *Cichorium intybus* (PDB 1ST8), para obtener las posiciones de los aminoácidos que convierten la actividad de transglucosilación en una actividad de invertasa. **A** fructosilexohidrolasa silvestre, **B** fructosilexohidrolasa con las mutantes W161Y y N166S.

Por otro lado, Schroeven y colaboradores (Lasseur *et al.*, 2009; Van den Ende *et al.*, 2009), modificaron una invertasa vacuolar de trigo basándose en alineamientos con enzimas transfructosilantes como la sacarosa: sacarosa 1- fructosiltransferasa (1-SST) donde observaron que las fructosiltransferasas varían en el primer motivo conservado de las invertasas (WMNDPNG) y al realizar una doble mutante en ese primer motivo por YMSDPNG, lograron aumentar la actividad de transfructosilación hasta 17 veces más que la enzima silvestre (**Figura 8**).



**Figura 8.** Aminoácidos de la tríada catalítica en gris y aminoácidos modificados en magenta en una invertasa de *Arabidopsis thaliana* (PDB 2AC1), para obtener las posiciones de los aminoácidos que aumentan la capacidad de transfructosilación hasta 17 veces más de una invertasa de *Arabidopsis thaliana*. **A** invertasa silvestre, **B** invertasa con las mutantes W20Y y N22S

También Sainz-Polo y colaboradores (2012) realizaron un análisis estructural de la  $\beta$ -fructofuranosidasa de la levadura *Schwanniomyces occidentalis* y observaron que la Q228 está involucrado en el mecanismo de reacción de transfructosilación y que al sustituirlo por treonina (T) o asparagina (N) se aumenta la capacidad de transfructosilación de 1 hasta 5 veces más que la enzima silvestre, por otro lado, encontraron que la N254 tiene un papel importante en la especificidad del producto que se obtiene de la transfructosilación (**Figura 9**).



**Figura 9.** Aminoácidos de la tríada catalítica en verde y aminoácidos modificados en anaranjado en una fructofuranosidasa de *Schwanniomyces occidentalis* (PDB 3U14), para obtener las posiciones de los aminoácidos que aumentan la capacidad de transfructosilación de 1 a 5 veces más que de  $\beta$ -fructofuranosidasa silvestre de *Sw. Occidentalis*. **A** fructofuranosidasa silvestre, **B** fructofuranosidasa con las mutantes N254A y Q228T

#### Inulinasa ISO3 de *K. marxianus*

En el laboratorio 314 del Conjunto E, de la Facultad de Química, UNAM, actualmente contamos con varias cepas microbianas capaces de producir inulinasas, entre ellas destaca *K. marxianus* ISO3, una levadura que fue aislada de los residuos de agave de la industria tequilera (Tequilera Sauza, Tequila Jalisco). Esta cepa fue caracterizada morfológicamente por Robert en el 2013 (Robert, 2013). En el 2015 Guillén (Guillén, 2015) encontró que el sobrenadante presentaba actividad inulinolítica que generaba como productos fructosa y fructooligosacáridos detectados por medio de cromatografía en capa fina. Posteriormente en 2017 Trapala purificó a la enzima y determinó sus características bioquímicas encontrando que Inu-ISO3 es un dímero de 256 kDa, con un porcentaje de 28% de glicosilación y con actividad de exoinulinasa sobre agavina, (Trapala, *et al.*, 2019). Actualmente se cuenta con la enzima clonada y expresada en *Picchia pastoris*

(rINU-ISO3), las propiedades bioquímicas y cinéticas de la proteína recombinante en general se conservaron, observándose pequeños cambios en las constantes catalíticas, esto tal vez debido al efecto que pudiera tener el patrón de glicosilación (Trapala *et al.*, 2023). En 2020 la estructura tridimensional de la inulinasa de *K. marxianus* fue liberada en el Protein Data Bank por el grupo de Hu, X-J con el código 6J0T, es importante señalar que la estructura corresponde al 100% de identidad con Inu-ISO3.

## II. Justificación

Se han estudiado enzimas de la familia GH32, como invertasas o fructosiltransferasas para la producción de fructooligosacáridos y son muy pocos los reportes con inulinasas, entre ellos destaca el reporte de Goosen; en donde encontró que el motivo G conformado por SVEVF que se encuentra entre la hendidura de los dominios  $\beta$ -propela y  $\beta$ -sandwich juega un papel importante en la eficiencia catalítica de la exo-inulinasa extracelular de *Aspergillus niger*, en esta enzima se realizó la sustitución de la S469 por Valina y Treonina, observándose un aumento en la actividad de transfructosilación hasta un 25% y 50% respectivamente, (Goosen *et al.*, 2007).

Actualmente no se cuentan con estudios que relacionen el efecto del cambio de los aminoácidos cercanos a la triada catalítica y que no pertenezcan a los dominios conservados sobre la actividad de transfructosilación de las inulinasas. Por tal razón es necesario llevar a cabo, estudios a nivel estructural para tener una nueva perspectiva en la exploración de las propiedades catalíticas de estas enzimas en la producción de fructooligosacáridos.



### III. Hipótesis y objetivos

#### III.1 Hipótesis

La actividad de transfructosilación de la inulinasa recombinante rInu-ISO3 de *K. marxianus* podría aumentar al realizar mutaciones en los aminoácidos aromáticos y polares dentro de la cavidad catalítica.

#### III.2 Objetivo general

- Estudiar la actividad de transfructosilación de rInu-ISO3 después de modificar algunos aminoácidos cercanos a la triada catalítica.

#### Objetivos particulares

- Estudiar la transfructosilación usando la enzima rINU-ISO3 recombinante para la producción de FOS.
- Estudiar el efecto de las mutaciones en los aminoácidos aromáticos y polares dentro de la cavidad catalítica en la actividad de transfructosilación.
- Comparar la relación hidrólisis/transfructosilación entre la enzima rINU-ISO3 recombinante y las enzimas mutantes.

### IV. Materiales y Métodos

#### IV.1 Análisis estructural de Inulinasa ISO3 con respecto a organismos productores de enzimas transfructosilantes.

Con la intención de comparar y analizar las diferencias estructurales entre la inulinasa rINU-ISO3 de *K. marxianus* y enzimas productoras de FOS y determinar las mutaciones que podrían afectar la reacción de transfructosilación se llevó a cabo un alineamiento en BLAST con cinco invertasas, dos de *Saccharomyces. cerevisiae*, una de *Schwanniomyces occidentalis*, dos de *Allium sp* y cuatro transferasas tres de *Allium sp*, y una de *Aspergillus japonicus* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Se tomó como referencia la investigación

de Ritsema (Altenbach *et al.*, 2008; Ritsema, Vijn, 2004) donde realizaron alineaciones con organismos productores de la 1-SST(Sacarosa: Sacarosa 1-Fructosiltransferasa) e invertasas con actividad fructosiltransferasa.

Así mismo, se realizaron alineamientos de superficies entre la fructosiltransferasa de *A. japonicus*, la invertasa de *Arabidopsis thaliana* y la inulinasa rINU-ISO3 con el fin de comparar el sitio activo, las interacciones entre aminoácidos y analizar que aminoácidos pudieran determinar la transfructosilación o la hidrólisis de la sacarosa. En este caso se tomó como referencia el trabajo del grupo de M. Angela Sainz-Polo y colaboradores (Álvaro, *et al.*, 2012), donde emplea un una fructofuranosidasa de *Schw. occidentalis* que tiene una identidad de 46.26% con la rInu-ISO3, con el objetivo de comparar los aminoácidos que ellos modifican y que se encuentran de igual forma en la inulinasa ISO3.

Por último, para poder determinar aminoácidos de la inulinasa ISO3 que pudieran interactuar con los sustratos, se realizaron simulaciones de dinámica molecular con el programa GROMACS con la enzima libre y con la enzima en complejo con la sacarosa. Se hizo la preparación de la enzima y el sustrato utilizando PyMOL, se tomó la estructura ya cristalizada de la inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* (PDB 6J0T), se realizó un alineamiento con una exohidrolasa de *Cichorium intybus* en complejo con sacarosa (PDB 2ADD) con el objetivo de obtener las coordenadas de la sacarosa y poder formar el complejo enzima-sustrato para realizar las simulaciones.

El campo de fuerza utilizado fue AMBER99SB así como el modelo de agua SPCE con un tamaño de caja de 1.4nm y se llevó a cabo la dinámica por un tiempo total de 10 ns a una temperatura de 50°C a 1 atm de presión.

La sacarosa fue parametrizada usando el programa Antechamber para generar los archivos de topología y coordenadas para que tuviera las mismas características que el campo de fuerza.

Al término de la dinámica molecular se realizó el cálculo de RMSD (Desviación cuadrática media) de la sacarosa con respecto a la enzima, para determinar el intervalo de tiempo donde el complejo ligando-proteína se mantiene estable y con

ayuda del programa Gromacs y el algoritmo de Mecánica Molecular de Poisson-Boltzmann (MM-PBSA por sus siglas en inglés) se determinó la energía de unión del sustrato.

Una vez que se realizó el análisis *in silico*, se pasó a la parte experimental. Como primer paso se obtuvo la enzima recombinante purificada rINU-ISO3.

## IV.2 Obtención de rINU-ISO3 y mutantes

Trapala quien forma parte del grupo de trabajo del laboratorio 314 del Conjunto E, de la Facultad de Química, UNAM, clonó y expresó en *Pichia pastoris* X-33, a la exo-inulinasa ISO3, con el método descrito a continuación:

A partir del DNA genómico de *K. marxianus*, se amplificó el gen de la inulinasa usando los siguientes cebadores:

Cebador F: GCCGCGGCAAAGGAGTCAGTGCT                      Cebador con el sitio *SacII*

Cebador R: GCTCTAGACAAACGTTAAATTGGGTAACG                      Cebador con el sitio *XbaI*

Debido a que se eligió expresar a la proteína recombinante en *Pichia pastoris* X-33, se utilizó el plásmido pPICZ $\alpha$ B, éste codifica una señal de secreción del factor  $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae*, además de que permite la expresión inducible con metanol, contiene el gen de resistencia a zeocina y cuenta con una etiqueta de polihistidina (6xHis) para detección y purificación de la proteína recombinante.

Una vez que se amplificó el gen que sirvió como inserto y el plásmido, se realizó una doble digestión empleando las enzimas *SacII* y *XbaI* de la marca NEB.

Pasado el tiempo de la digestión se verificó la linealización del plásmido por medio de una electroforesis de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio, ya confirmada la linealización del plásmido se purificó la banda con el kit QIAquick y se cuantificó el producto purificado en un nanodrop.

Se llevó a cabo la reacción de ligación entre el vector y el inserto amplificado en una proporción 5:1 de inserto: vector con la DNA ligasa T4 de la marca NEB y el buffer incluido por el proveedor.

Se transformó el producto de la ligación en células quimio competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . El paquete celular que se obtuvo se sembró en placas LB con zeocina a una concentración de 25  $\mu$ g/mL, a 37°C durante toda la noche. Transcurrido el tiempo de incubación se resembraron en medio LB líquido con zeocina para realizar la extracción del DNA plasmídico.

Una vez obtenido el plásmido se linealizó con la enzima *Pme*1 para ser incorporado a células electro competentes de *P. pastoris* X-33 por medio de la electroporación siguiendo las especificaciones del fabricante.

Las células transformadas se crecieron en placas YPDS con zeocina a 30°C por 72h De las colonias que crecieron y seleccionaron para realizar PCR de colonia con los cebadores que amplifican a la inulinasa, para confirmar la presencia del gen.

Se resembraron las colonias en placas YPDS con zeocina para confirmar la resistencia y una vez que crecieron se tomaron parte de las colonias para sembrar en medio líquido YPD con zeocina para realizar gliceroles que se guardaron a -70°C para su posterior expresión.

En el grupo de trabajo del laboratorio 314 del Conjunto E, de la Facultad de Química, ya se contaba con dos mutantes F113A y W79A que de acuerdo al análisis *in silico* eran importantes para el estudio de la actividad de transfructosilación. Los cebadores que se utilizaron para obtener las mutantes se muestran en la **Tabla 7**

**Tabla 7.** Cebadores para las mutantes F114A y W79A

Mutante	Primers
*F113A	Forward: 5' ggt gcg gct agt ggt agt atg gtt atc ga 3' Reverse: 5' t acc act agc cgc acc agc gtc g 3'
*W79A	Forward: 5' cc acg atc gct ggt act cca ttg tac tgg ggt 3' Reverse: 5' gg agt acc agc gat cgt ggc tgc tgg gtt 3'

Los plásmidos del resto de las mutantes propuestas (W50F, W50A y Q236T) se diseñaron de acuerdo al método con el que se obtuvieron las mutantes F113A y W79A (Xia & Xun, 2017, Trapala, 2023).

### IV.3 Mutagénesis sitio-dirigida

Para la construcción de plásmidos se usaron los métodos de Xia y Trapala que se describen a continuación:

#### *Amplificación del plásmido pPICZαB-INU con las mutaciones*

Los cebadores que se emplearon para realizar las mutaciones que faltaban, se muestran en la **Tabla 8**.

**Tabla 8.** Cebadores para las mutantes W50F, W50A y Q236T

<b>Mutante</b>	<b>Primers</b>
W50F	Forward: 5' c cat ggt ttc atg aac gat cca aat ggt 3' Reverse 5' c gtt cat gaa acc atg gga tgg agt gaa 3'
W50A	Forward: 5' c cat ggt gcu atg aac gat cca aat ggt 3' Reverse 5' c gtt cat cgu acc atg gga tgg agt gaa 3'
Q236T	Forward: 5' ggt acc aca tac gaa tgc cca ggt cta 3' Reverse 5' ttc gta tgt ggt acc agt cca gcc gt 3'

Estos cebadores se realizaron en el servidor calculator tm NEB (<https://tcalculator.neb.com/>)

Para llevar a cabo la amplificación de los plásmidos con las mutantes correspondientes, se utilizó un termociclador Veriti 90 Well Thermal Cycler de AB Applied Biosystems usando las siguientes condiciones y los siguientes reactivos (**Tabla 9**)

Condiciones: Desnaturalización a 95°C por 2 min, segunda desnaturalización a 95°C por 20 s, el alineamiento se realizó a diferentes a temperaturas: 61, 64, 67 y 70°C por 30 s con la finalidad de encontrar la mejor temperatura, elongación 68°C

por 6 min y por último una elongación final 68°C por 6 min, todo este ciclo se repitió 30 veces.

**Tabla 9.** *Reactivos que se utilizaron para PCR*

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Concentración final</b>
H <sub>2</sub> O	7.7	cbp
Buffer 5x	1.5	1 x
dNTP's 50mM	1.5	5 mM
Plásmido pPICZ $\alpha$ B-INU	0.5	0.25 $\mu$ g/ $\mu$ L
DMSO 10%	1.5	10% v/v
Taq Polimerasa ( 5 U/ $\mu$ L)	0.3	0.1 U/ $\mu$ L
Cebadores (F) para gen INU-ISO3 y para mutantes 50 $\mu$ M	1	3.3 $\mu$ M
Cebadores (R) para gen INU-ISO3 y para mutantes 50 $\mu$ M	1	3.3 $\mu$ M

Una vez realizada la amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% para observar a que temperatura se amplificaba mejor cada mutante.

#### *Purificación de DNA*

Determinada la temperatura de amplificación se realizaron reacciones de PCR de 50  $\mu$ L para la obtención de los plásmidos, se realizó la digestión del DNA parental colocando 2  $\mu$ L de la enzima de restricción *DpnI* y se incubó a 37°C por 2 h.

Para la separación del DNA se realizó una electroforesis en gel de agarosa al1%, posteriormente se cortaron las bandas correspondientes a los productos de interés y se extrajeron del gel teniendo cuidado del tiempo de exposición de la luz UV para evitar la generación de mutaciones no deseada en los plásmidos. Para la purificación de las bandas se utilizó el kit QIAquick gel extraction de Qiagen, de acuerdo a las especificaciones del proveedor, posteriormente con el plásmido puro

se transformaron células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . La transformación se realizó de acuerdo al manual del proveedor (thermofisher).

### *Transformación de células quimiocompetentes de E. coli DH5 $\alpha$ (Trapala, 2023)*

El primer paso para propagar los genes de interés fue la producción de células competentes.

#### *Células competentes*

Se incubaron 5 mL medio de LB con bacterias *E. coli* DH5  $\alpha$  a 37°C toda la noche a 250 rpm, posteriormente se colocó 1 mL de cultivo en 100 mL de medio LB y se incubó de 2-3 h hasta alcanzar una densidad óptica de  $D_{0600nm} = 0.3-0.6$ , se colocó en un baño de hielo y se pasó a tubos de centrifuga estériles y fríos. Se centrifugó a 4600 rpm a 4°C por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió suavemente en una proporción 1:20 en medio 2XYT-CC (que contiene 1.5% Medio LB, 0.7% NaCl, 10% PEG4000, 5% DMSO, 0.12% MgSO<sub>4</sub>, 0.1% MgCl<sub>2</sub> y 10% glicerol) Después se incubó en hielo por 10 min y se hicieron alícuotas de 200  $\mu$ L en tubos estériles y fríos que se congelaron con hielo seco y acetona para almacenarlos a -80°C.

#### *Transformación de las células competentes*

Para transformar las células competentes con el plásmido de interés, una alícuota de estas se colocó durante 5 min en hielo, se tomaron 20 $\mu$ L de plásmido pPICZ $\alpha$ B-*INU* en buffer KCM frío (que contiene 0.75% KCl, 0.33% CaCl<sub>2</sub> y 0.5% de MgCl<sub>2</sub>) y se mezclaron cuidadosamente, la mezcla se incubó por 30 min en hielo, posteriormente se realizó un choque térmico a 42°C por 90 s sin agitación y se colocaron en hielo por 2 min. A temperatura ambiente se agregaron 500  $\mu$ L de medio LB y se incubó a 37°C a 250 rpm por 1 h. Después de este tiempo las células se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min, se eliminaron 2/3 partes de sobrenadante y las células se resuspendieron con cuidado, por último, se plaqueó en una caja con medio LB y zeocina 25  $\mu$ g/ mL

#### *Selección de colonias transformantes.*

De las placas con LB y zeocina se seleccionaron 6 colonias, se resuspendieron en medio líquido LB y se incubaron a 37°C no más de 20 h a 180 rpm. El cultivo celular se centrifugó a 12000 rpm por 5 min en tubos estériles de 1.5 mL para realizar la extracción del DNA con el Kit QIAprep Spin Miniprep de QIAGEN de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

#### *Cuantificación y secuenciación del DNA plasmídico.*

La cuantificación de los plásmidos purificados se hizo en un NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Por último, las muestras fueron enviadas al laboratorio Macrogen Inc. en Corea del Sur para su secuenciación.

Se hizo el análisis de los resultados obtenidos de la secuenciación con ayuda de ExPASy, una herramienta informática, donde se verificó que no hubiera codones de paro y que tuvieran únicamente la mutante que se propuso.

#### **IV.4 Expresión de Inu-ISO3 recombinante (rINU-ISO3) y sus mutantes.**

El crecimiento de la cepa de *Pichia pastoris* X-33 transformada con el gen de la Inulinasa de *K. marxianus* ISO3 y sus mutantes se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL, en un volumen total de 50 mL de medio BMGY con 30 µL de células de *Pichia pastoris* X33 previamente transformadas con el vector pPICZαB-INU para rINU-ISO3, y tomando una colonia para las mutantes F113A y W79A, los tres preinóculos se dejaron crecer por 48h a 30° C y 250 rpm.

Posteriormente, los preinóculos se centrifugaron a 7000 rpm por 10 min. El paquete celular resultante de cada preinóculo se resuspendió en 200 mL de medio base BMMY, en matraces Erlenmeyer de 1000 mL. Se verificó que la densidad óptica inicial ( $OD_{600}$  inicial) fuera de 1. Las condiciones que se utilizaron para realizar el crecimiento fueron: temperatura 28°C, agitación a 240 rpm por 5 días (Incubadora WiseCube) agregando metanol absoluto en una concentración de 1% v/v cada 24 horas para la inducción de las enzimas rINU-ISO3, F113A y W79A. Durante los días



de inducción se monitoreó la expresión enzimática por medio de su actividad enzimática usando sacarosa como sustrato de hidrólisis rápida.

#### IV.5 Purificación de la inulinasa

Con la finalidad de purificar a la proteína extracelular, se siguió el método de Trapala (Trapala, 2023), se centrifugó el medio de cultivo BMMY a 7000 rpm a 4°C por 10 min para separar las células del sobrenadante. El sobrenadante recuperado se filtró con una membrana de polipropileno Millipore de 0.45 µm de diámetro.

Una vez filtrado el sobrenadante, se purificó mediante una columna de afinidad de níquel FF HisTrap™ de 5 mL, previamente regenerada, cuya resina presenta gran afinidad a la etiqueta de histidinas que contienen nuestras proteínas de interés en el carboxilo terminal.

Cromatograma obtenido del paso de la purificación del sobrenadante de la enzima recombinante, Se utilizó una columna de 5 mL His Trap HP, a un flujo de 2 mL/min, con una presión de 0.42 MPa, con Buffer A: fosfatos 50 mM, 100 mM NaCl, 25 mM de imidazol y Buffer B: fosfatos 50 mM, 100 mM NaCl, 1 M de imidazol, se realizó un gradiente de 10 volúmenes de columna de 0 a 100% de buffer B, que se muestra en color verde.

Se realizaron lavados de la columna His Trap HP con buffer de fosfatos 50 mM pH 7.2, 100 mM de NaCl, 20 mM de imidazol. Posteriormente se inyectaron 50 mL del sobrenadante y se realizó un gradiente de 10 volúmenes de columna de 0 a 100% de imidazol de 20 mM a 1 M.

Por último, se dializó y se concentró la proteína con una membrana de ultracel de celulosa regenerada de 30 kDa de 15 mL, se centrifugó a 5000 rpm por 10 min a 4°C, y se hicieron tres lavados con buffer de acetatos 50 mM pH 5.5 a las mismas condiciones de centrifugado.

La pureza de la inulinasa se verificó mediante electroforesis SDS-PAGE. Para ello se utilizó un gel de acrilamida al 10%, se cargaron 10 µg de proteína, y se corrió el

gel a un voltaje constante de 100 V. La masa molar de las bandas obtenidas se estimó comparándolas con un estándar de peso molecular conocido.

#### IV.6 Determinación de la cantidad de proteína soluble.

La concentración de proteína soluble se determinó empleando el método de Bradford (1976). A 50  $\mu\text{L}$  de muestra se agregaron 750 $\mu\text{L}$  de agua destilada y 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford y se dejó reposar por 5 min. La mezcla se agitó en un vórtex durante 15 s. La absorbancia se leyó a 595 nm. Como blanco se utilizaron 800  $\mu\text{L}$  de agua destilada con 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford, y se preparó una curva de calibración con albúmina de suero bovino como estándar en concentraciones de 0.0 a 8.75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Anexo A, **Figura A.1**), las cuales se trataron bajo las mismas condiciones.

#### IV.7 Determinación de la actividad de transfructosilación

Para determinar la capacidad de la enzima para realizar la transfructosilación se determinaron las condiciones óptimas de la reacción de hidrólisis enzimática con sacarosa y partir de ellas para encontrar las mejores condiciones para la síntesis de fructooligosacáridos.

La determinación de la actividad hidrolítica de rINU-ISO3 se llevó a cabo en un volumen total de 500  $\mu\text{L}$  y sacarosa 120 mM (se utilizó una alta concentración de sacarosa debido a que la mutante W79A no presentó actividad enzimática a concentraciones más bajas durante el seguimiento de expresión de enzimas a una temperatura de 60°C y buffer de acetatos pH 4.5).

Una unidad de actividad (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para transformar 1  $\mu\text{mol}$  de fructosa por min (Álvaro *et al.*, 2012).

Para cuantificar los productos (azúcares reductores) de la reacción de hidrólisis catalizada por la inulinasa, se construyó una curva patrón de fructosa (Anexo A, **Figura A.2**) empleando el método del ácido dinitro-salicílico (DNS) (Miller, 1959). En tubos de ensayo de 5 mL se colocaron 200  $\mu\text{L}$  de buffer de acetatos 50mM pH 5, 100  $\mu\text{L}$  de muestra y 600  $\mu\text{L}$  de reactivo DNS. Los tubos se calentaron a 90°C por

5 min y posteriormente se enfriaron en hielo por 20 min, por último, se añadieron 4 mL de agua destilada a cada muestra para leer la absorbancia a 540 nm.

Después de determinar las condiciones óptimas de reacción de hidrólisis enzimática (pH 4.5 a 60°C y 450 rpm) se evaluó la capacidad de rINU-ISO3 para realizar la reacción de transfructosilación utilizando sacarosa como sustrato único. Se utilizaron diferentes condiciones tales como; concentración de sacarosa, tiempos de reacción, temperatura y pH.

Una vez determinadas las condiciones óptimas para la reacción de transfructosilación de rlnu-ISO3, estas se utilizaron para evaluar a las mutantes F113A y W79A, que fueron pH 5.5, a 25°C, 450 rpm a 20 min con 1500 mM de sacarosa

#### *Efecto de la concentración de sacarosa y tiempos de reacción en la actividad de transfructosilación.*

Los ensayos enzimáticos se realizaron en un volumen total de reacción de 200 µL con diferentes concentraciones de sacarosa desde 300 mM hasta 1800 mM, la reacción se inició con la cantidad de enzima necesaria para alcanzar una actividad enzimática de 34 U/mL, pH 4.5 y 50°C Los productos de reacción se analizaron a intervalos de tiempo de 5 min hasta 2 h. Posteriormente, los productos de la reacción enzimática se observaron por cromatografía en capa fina (TLC por sus siglas en inglés).

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

Una vez determinada la concentración de sacarosa y el tiempo de reacción de transfructosilación en dónde se observó la producción de FOS se realizaron ensayos a pH 4.5 y se ensayaron diferentes temperaturas de reacción, las cuales fueron 25, 40, 50, 60 y 70 °C. Posteriormente se llevaron a cabo reacciones variando los valores de pH que fueron 3.5, 4.5, 5.5, 6.5 y 7.5 para determinar el pH óptimo para la actividad de transfructosilación.

Para las reacciones con rINU-ISO3 se pesaron 100 mg de sacarosa y se resuspendió con 150  $\mu$ L de buffer y se agregaron 55  $\mu$ L de la enzima purificada, hasta obtener un volumen final de 205  $\mu$ L y una concentración final de 1500 mM de sacarosa y una actividad enzimática de 34 U/mL.

Las reacciones con la mutante F113A se pesaron 120 mg de sacarosa que se resuspendió con 150  $\mu$ L de buffer y se agregaron 89  $\mu$ L (1.78 veces más que rINU-ISO3) de la enzima purificada, hasta obtener un volumen final de 239  $\mu$ L y una concentración final de 1500 mM de sacarosa y una actividad enzimática de 34 U/mL.

Para la mutante W79A se pesaron 210 mg de sacarosa que se resuspendió con 150  $\mu$ L de buffer y se agregaron 267  $\mu$ L (5.34 veces más que rINU-ISO3) de la enzima purificada, hasta obtener un volumen final de 417  $\mu$ L y una concentración final de 1500 mM de sacarosa y una actividad enzimática de 34 U/mL.

Las reacciones se detuvieron a 90°C por 10 min para su posterior análisis cromatográfico.

Los productos de reacción se observaron por TLC y posteriormente por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC por sus siglas en inglés) y se determinó la relación hidrólisis/transfructosilación.

Para observar los productos de reacción mediante TLC, se utilizaron placas de sílica en aluminio de 5 x 10 cm como fase estacionaria, y una mezcla de butanol, metanol y agua (3:2:1), como fase móvil. Se aplicó 1  $\mu$ L de las muestras en las placas, se eluyeron durante 1h y posteriormente se revelaron por aspersion con una disolución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5 % en etanol con 10 mg/mL de orcinol, finalmente las placas se calentaron a 90 °C hasta que se observaron las marcas de los carbohidratos.

Con el objetivo de separar mejor las muestras se utilizó una segunda fase móvil de butanol, etanol, agua y ácido acético (3:2:0.7:0.3) y las placas se dejaron eluir por 1.5 h para posteriormente revelarlas con el mismo método ya descrito.

La cromatografía líquida de alta eficiencia se llevó a cabo en un equipo HPLC acoplado a una columna UK UNISON (3 mm) equilibrada a 50°C, a un flujo de 0.7 mL/min, empleando una fase móvil de acetonitrilo(A): agua(B). Se utilizó un

gradiente de concentración de 10% B (0-6 min), 10-25% (6-20 min), 25-35% (20-35 min), 35-40% (35-50 min), 40-10% (50-65 min). Este método se empleó para cuantificar la glucosa y fructosa remanentes de la reacción enzimática.

## V. Resultados y discusión

### V.1 Análisis estructural de Inulinasa ISO3

#### Alineamientos con BLAST

De acuerdo a los alineamientos obtenidos en BLAST, se observó que en el motivo (WMNDPNG) el triptófano (W) está altamente conservado en enzimas como la invertasa y la inulinasa ISO3, a diferencia de las fructosiltransferasas de *Allium* spp. donde se sustituye por fenilalanina (F) y tirosina (Y) en la posición equivalente (**Figura 10**). Anteriormente Aguado en 2011, describió que una modificación en este primer motivo en una invertasa de *Allium cepa* incrementó en la producción de 1-kestosa (Aguado, 2011).

INU-ISO3 <i>K. marxianus</i>	40	PSVHFTPSHG <b>W</b> MNDP <b>N</b> GLW	58
Invertasa <i>S.cerevisiae</i>	9	PLVHFTPNKG <b>W</b> MNDP <b>N</b> GLW	27
Invertasa Schw.occidentalis	10	PLIHFTPEKG <b>W</b> MNDP <b>N</b> GLF	28
Invertasa <i>Allium ce</i>	15	TGFHFQPVKN <b>W</b> MNDP <b>N</b> GPL	35
Invertasa vacuolar <i>Allium cepa</i>	1	----- <b>W</b> MNDP <b>N</b> GPM	9
Beta-fructofuranosidasa <i>S.cerevisiae</i>	20	PLVHFTPNKG <b>W</b> MNDP <b>N</b> GLW	39
1-SST <i>Allium sativum</i>	85	PGYHFQPPYH <b>F</b> MGDP <b>N</b> AAM	103
1-SST <i>Allium cepa</i>	13	TGYHFQPPNH <b>F</b> MADP <b>N</b> AAM	31
6G-FFT <i>Allium cepa</i>	75	CGFHFRTVRN <b>Y</b> MNDP <b>S</b> GLW	94
Fructosiltransferasa <i>A.japonicus</i>	28	PRAHILPAEG <b>Q</b> IGDPCAHY	48

**Figura 10.** Alineamientos de secuencias con INU-ISO3, invertasas y fructosiltransferasas en el primer motivo conservado, para encontrar los aminoácidos que se diferencian entre enzimas.

Por otro lado, Ritsema y colaboradores realizaron un análisis de secuencias con diferentes enzimas entre ellas invertasas (INV) y fructosiltransferasas; sacarosa: sacarosa 1-fructosiltransferasa (1SST), fructano; fructano 6G-fructosiltransferasa (6GFT), fructano: fructano 6G-fructosiltransferasa (6SFT) de especies de plantas de las cuales observaron el mismo patrón donde las invertasas mantienen el triptófano (W) del primer motivo y en las fructosiltransferasas se sustituye por una

fenilalanina (F) o tirosina (Y) (**Figura 11**). Al realizar una mutación en el residuo de triptófano (W) observaron que la actividad enzimática de invertasa se desplaza hacia la transfructosilación, por lo tanto, la presencia de este triptófano está ligada a la hidrólisis de la sacarosa y la presencia de una fenilalanina o tirosina favorecen la actividad de transfructosilación. (Altenbach et al., 2009)

Plant species	Family	Protein	Amino acid sequence	nr.
<i>Allium cepa</i>	L	INV	NQMLSWQRTGFHFQPVK <b>W</b> NDPNGPLYYKGWY	175
<i>Allium cepa</i>	L	6GFT	NDMLAWQRCGFHFRTV <b>R</b> NYNDPSGPMYYKGWY	96
<i>Asparagus off.</i>	L	INV	NKMLSWQRTGFHFQPEK <b>W</b> NDPNGPLYYKGWY	143
<i>Hordeum vulgare</i>	P	INV	NAMLQWQRTGFHFQPEK <b>W</b> NDPNGPVYYKGWY	148
<i>Lolium perenne</i>	P	INV	NAMLQWQRTGFHFQPEK <b>W</b> NDPNGPVYYKGWY	150
<i>Triticum aestivum</i>	P	INV	NAMLQWQRTGFHFQPEK <b>W</b> NDPNGPVYYKGWY	155
<i>Cichorium intybus</i>	A	INV	NNMLDWQRTAFHFQPK <b>K</b> W <b>W</b> NDPNGPVFYNGWY	149
<i>Allium cepa</i>	L	1SST	NEMLKWQRTGYHFQPP <b>N</b> IFMADPNAAMYYKGWY	108
<i>Hordeum vulgare</i>	P	1SST	NAMLQWQRTGFHFQPD <b>K</b> YYCNDPNGPVYYGGWY	117
<i>Lolium perenne</i>	P	1SST	NAMLQWQRTGFHFQPE <b>Q</b> HYNDPNGPVYYGGWY	137
<i>Triticum aestivum</i>	P	1SST	NAMLQWQRTGYHFQPD <b>K</b> YYCNDPNGPVYYGGWY	147
<i>Cichorium intybus</i>	A	1SST	NADVEWQRSAYHFQPD <b>K</b> IFSDPDGPMYHMGWY	131
<i>Helianthus tuber.</i>	A	1SST	SAEVEWQRSTYHFQPD <b>K</b> IFSDPDGPMYHMGWY	119
<i>Hordeum vulgare</i>	P	6SFT	NEMLQWQRSYHFQ <b>TAK</b> TYNSDPNGLMYYRGWY	107
<i>Lolium perenne</i>	P	6SFT	NEMLQWQRAGFYHFQ <b>PEG</b> IFNSDPNGPVYYRGY	115
<i>Triticum aestivum</i>	P	6SFT	NEMLQWQRSYHFQ <b>TAK</b> TYNSDPNGLMYYRGWY	105
<i>Triticum aestivum</i>	P	1FFT	NAMLQWQRTGYHFQPE <b>K</b> NYCNDPNGPVYYKGWY	134
<i>Cichorium intybus</i>	A	1FFT	SDRLTWERTAYHFQ <b>PAK</b> IFSDPDGPMYHMGWY	115
<i>Helianthus tuber.</i>	A	1FFT	TDRLSWERTAFHFQ <b>PAK</b> IFSDPDGQLFHMWY	113
<i>Asparagus off.</i>	L	6GFT	NQMLTWQRAGFYHFRTV <b>K</b> NYNDPSGPMYYKGWY	93

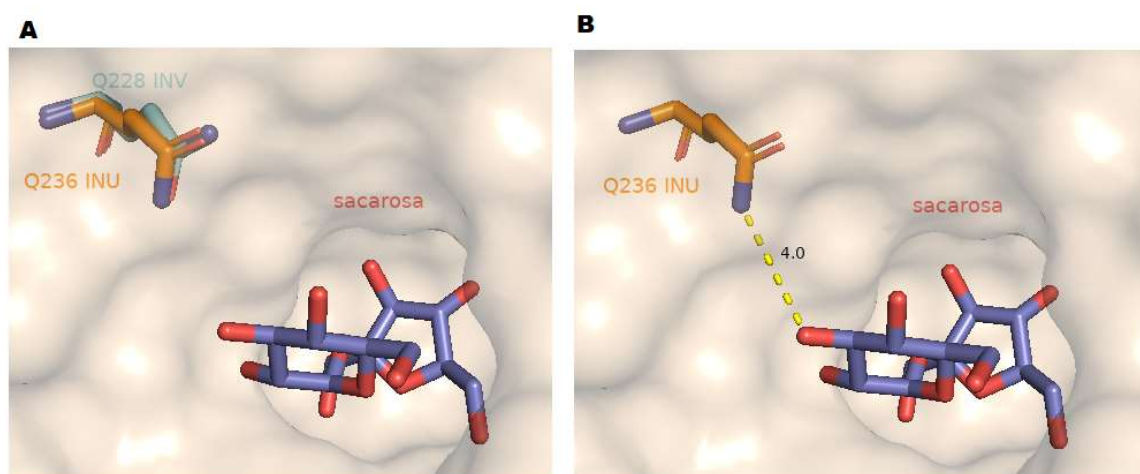
**Figura 11.** Alineamientos del dominio conservado WMNDPNG entre enzimas invertasas (INV) y transfructosidasas (6SFT y 1SST), realizados por el grupo de Ritsema y colaboradores (2006).

Con estos antecedentes se propuso la primer mutante W50F en la exoinulinasa rINU-ISO3.

El grupo de Julia Sanz en 2012, realizó una investigación que asoció directamente la especificidad de la actividad fructofuranosidasa transferasa (F-fase transferasa) con residuos ubicados alrededor del tercer motivo conservado (EC) donde se encuentra la glutamina (Q) un aminoácido que parece estar interaccionando con la fructosa ubicada en el sitio +1 de la cavidad catalítica. Al sustituir la glutamina por treonina (T) o asparagina (N) se aumentó de 1-5 veces la capacidad de transfructosilación inicial de una Beta-fructafuranosidasa de *Schw. occidentalis*,

También encontraron que al modificar glutamina por aminoácidos de cadena lateral corta como treonina o valina (V) se disminuye la eficiencia catalítica hacia sustratos de mayor tamaño como la inulina y permiten un mejor reconocimiento de la sacarosa transferida (Álvaro, *et al.*, 2012).

Al realizar los alineamientos estructurales de las enzimas del grupo de Julia Sanz con nuestra exoinulinasa se puede observar que la Q236 se conserva en todas las enzimas en la misma posición e interactúa con el sustrato a través de puentes de hidrógeno en la posición +1 (**Figura 12**).



**Figura 12.** Alineamiento de INU-ISO3 (6J0T) y Beta-fructofuranosidasa (3U14) para identificar si la glutamina que modifica el grupo de Julia Sanz y la inulinasa se encuentran en la misma posición. **A:** Alineamiento de 6J0T y 3u14 (Beta-fructofuranosidasa) en verde con azul Q228 de la 3u14, en anaranjado con azul Q236 de 6J0T, **B:** Interacción entre el residuo Q236 y la sacarosa como sustrato.

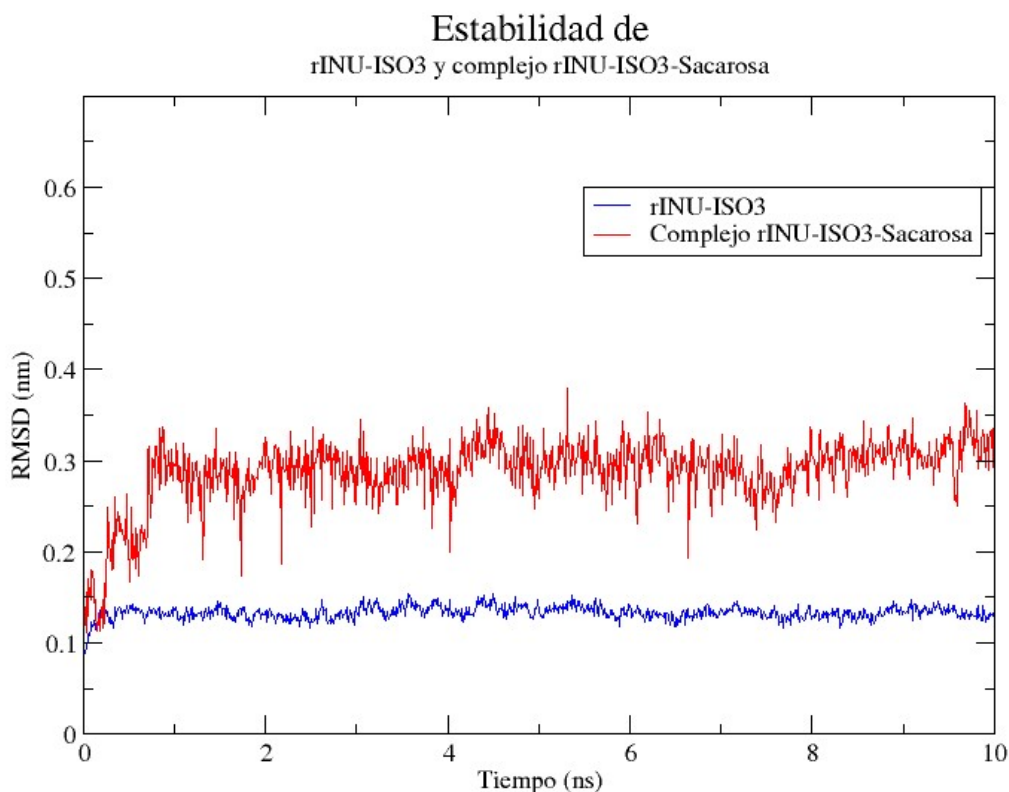
#### Dinámica molecular de rINU-ISO3.

Con el fin de analizar la interacción de la sacarosa con los aminoácidos cercanos a la triada catalítica, el primer objetivo de la dinámica molecular para este sistema fue estudiar la estabilidad de rINU-ISO3 y la permanencia de la sacarosa en el sitio catalítico de la enzima. Se determinaron cuáles son los residuos que interactúan con la sacarosa para revisar posibles mutaciones que podrían afectar la actividad de transfructosilación.

La dinámica molecular de rINU-ISO3 de *K. marxianus* y la sacarosa como sustrato, se llevó a cabo en un campo de fuerza de AMBER99SB a una temperatura de equilibrio de 323 K (50°C, temperatura óptima de actividad hidrolítica para la exoinulinasa).

Para poder evaluar la estabilidad de la enzima a lo largo de la dinámica molecular se determinó la raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) que se utiliza para medir la diferencia entre la conformación estructural inicial y final de la proteína a lo largo de la dinámica, entre más pequeñas sean las desviaciones en el transcurso de la simulación es más estable la estructura de la proteína.

En la **Figura 13** de color azul se muestra la estabilidad que mantiene la enzima a lo largo de la dinámica molecular de 10 ns con un valor que se mantiene en 0.125 nm desde el primer nanosegundo de la simulación.





**Figura 13.** *RMSD de rInu-ISO3 (Color azul) y el complejo rINU-ISO3 con sacarosa (Color rojo), las dinámicas se llevaron a cabo por 10 ns a una temperatura de 50°C a 1 atm de presión.*

Monzón y colaboradores (Monzón et al., 2017) realizaron un análisis de las estructuras de 183 proteínas y clasificaron tres grupos de proteínas en función de su diversidad conformacional:

- Proteínas rígidas: Se caracterizan porque no tienen regiones desordenadas, forman cavidades pequeñas y presentan un RMSD promedio de 0.083 nm
- Proteínas parcialmente desordenadas: Presentan regiones desordenadas y en promedio presentan un RMSD de 0.11 nm
- Proteínas maleables: Estas proteínas presentan regiones desordenadas, muestran una mayor diversidad de ligandos afines y presentan un RMSD promedio de 0.13 nm.

Con base a la clasificación de Monzón y colaboradores, rINU-ISO3 es una proteína maleable y presenta afinidad a diversos sustratos como inulina de chicoria, inulina de agave y sacarosa.

Después de que se verificó la estabilidad de la proteína, el segundo paso fue construir el complejo rINU-ISO3-sacarosa. Los resultados de la dinámica molecular, mostraron que a partir de 1 ns el complejo rINU-ISO3-sacarosa permanece estable, con un RMSD que se mantiene alrededor de 0.3 nm a lo largo de la dinámica (**Figura 133** color rojo).

Una vez que el sistema se estabilizó, el siguiente paso fue observar, la interacción de la sacarosa con los residuos cercanos a la tríada catalítica. Para ello se determinó la energía de unión de cada aminoácido tomando en cuenta la energía de solvatación polar, apolar y mecánica, de acuerdo al método MM-PBSA donde la energía libre del complejo enzima-sustrato se estima a partir de la siguiente ecuación:

$$G = E_{\text{bnd}} + E_{\text{cl}} + E_{\text{vdW}} + G_{\text{pol}} + G_{\text{np}} - TS$$

Donde los primeros tres términos de energía pertenecen a la energía mecánica y toman en cuenta las interacciones de enlace, el ángulo diedro, las energías electrostáticas y de van der Waals que son  $G_{pol}$  y  $G_{np}$  que son las contribuciones polares y no polares a las energías libres de solvatación, el último término es de la temperatura absoluta  $T$ , que multiplica a la entropía  $S$  (Genheden & Ryde, 2015; Suenaga et al., 2012).

Se observó que dentro de los aminoácidos que tienen una menor energía de unión, es decir, aquellos que interactúan con la sacarosa (**Tabla 10**) se encuentran el D53 y D182, aminoácidos que pertenecen a la triada catalítica y residuos como W79, F113 y W335 son más afines con respecto a N52, Q71, S114 y Y312.

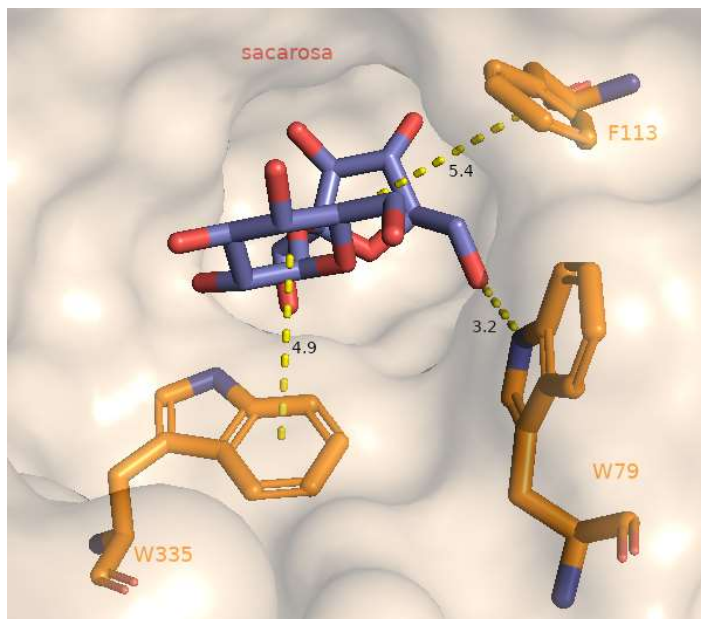
**Tabla 10.** Energía de unión del complejo E-S (Sacarosa-rINU-ISO3)

Aminoácidos	Energía de unión del complejo inulinasa-sacarosa (kJ/mol)
N 52	-6.84
D 53	-4.01
E 71	-5.13
W 79	-10.66
F 113	-9.37
S 114	-4.12
D 182	-12.32
Y 312	-3.57
W 335	-9.82

Los aminoácidos que pertenecen a la triada catalítica están resaltados en color verde, los aminoácidos con energía de unión favorable remarcados en color azul

Estos tres residuos de aminoácidos (W79, F113 y W335) podrían ser relevantes en la estabilidad del sustrato dentro del sitio activo, como se observa en la **Figura 14**, El residuo W79 interactúa con la fructosa en la posición -1 mediante puentes de hidrógeno con una distancia de 3.2 Å, por otro lado, W335 y F113A presentan interacciones no covalentes (tipo *stacking*) entre los anillos

aromáticos de los aminoácidos y la sacarosa, con apilamientos desplazados entre F113 y la fructosa en la posición -1 a una distancia de 4.9 Å y W334 con la glucosa en la posición +1 con una distancia de 5.4 Å.



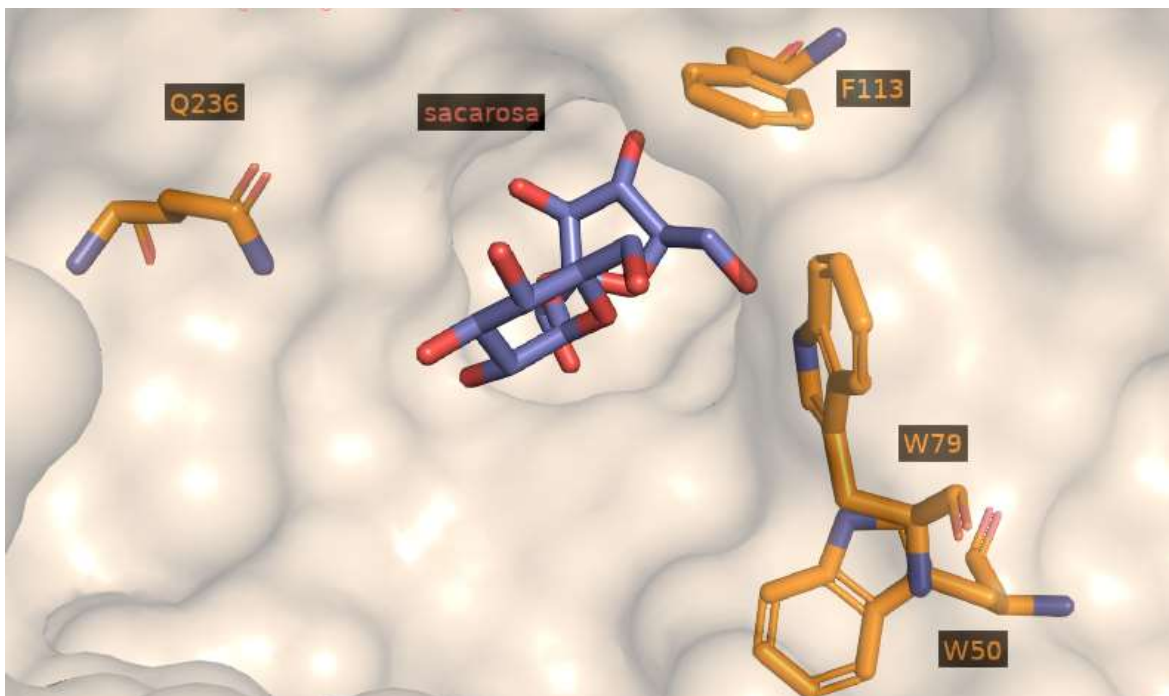
**Figura 14.** Interacciones entre los aminoácidos de menor energía de unión del complejo enzima-sustrato. Por un lado, W79 forma un puente de hidrógeno en la posición -1 y por otro F113 y W335 interacciones tipo stacking en la posición -1 y +1 respectivamente.

Cabe mencionar que estos tres aminoácidos están conservados en las enzimas que pertenecen a la familia GH32, por ejemplo, en la fructofuranosidasa de *Schwanniomyces occidentalis*, la invertasa de *Arabidopsis thaliana* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*, por mencionar algunas.

Julia Sanz y colaboradores mencionan que la fructosa se encuentra fuertemente unida en la posición -1 de la cavidad catalítica por enlaces de hidrógeno de todos sus grupos hidroxilo a las cadenas laterales de N49, Q68, W76, S111 y D170 en fructofuranosidasa de *Schw. Occidentalis*, aminoácidos que también se encuentran en inulinasa de *K. marxianus*: N52, Q71, W79, S114 y D182 respectivamente. Por lo que podemos pensar que restos residuos juegan un papel importante en el reconocimiento del sustrato que comparten las enzimas de dicha familia (Álvaro et al., 2012). Con los resultados de la dinámica

molecular y la información de la literatura, se propuso modificar a W79 y F113, que interactúan en la posición -1 con la sacarosa por un aminoácido no polar más pequeño como alanina con la intención de que la cavidad catalítica sea más profunda e impida el acceso a moléculas de agua y se favorezca la actividad de transfructosilación.

Finalmente, de acuerdo al análisis estructural conformado por alineamientos de secuencia, estructura y dinámica molecular se eligieron 4 residuos a mutar (**Figura 15**) para estudiar el efecto que tienen en la actividad de la transfructosilación, tres aminoácidos aromáticos que son W50F, W79A y F113A y un aminoácido polar Q236T, que están presentes en la cavidad catalítica e interactúan con la sacarosa.

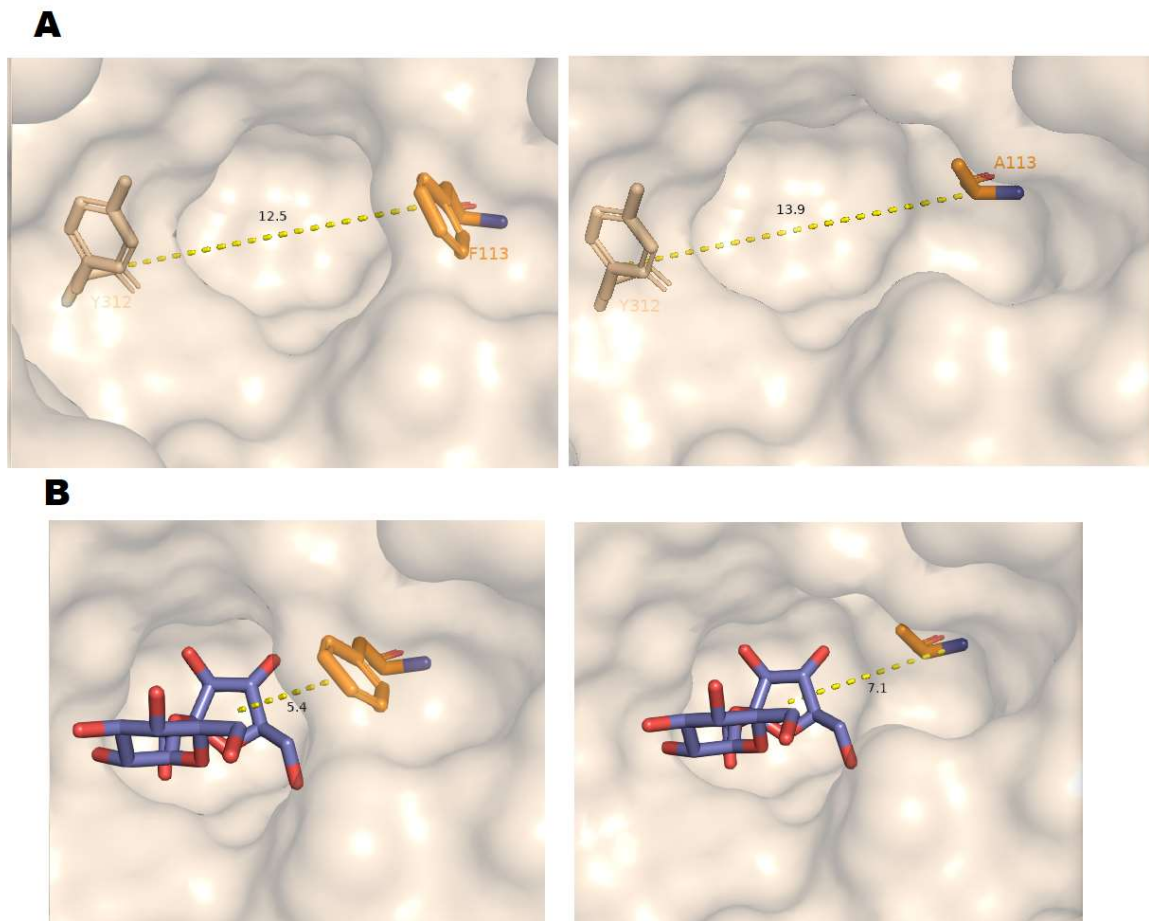


**Figura 15.** Aminoácidos propuestos para realizar mutaciones de la rINU-ISO3 en color anaranjado.

## Dinámicas moleculares de las diferentes mutantes propuestas

### ➤ F113A

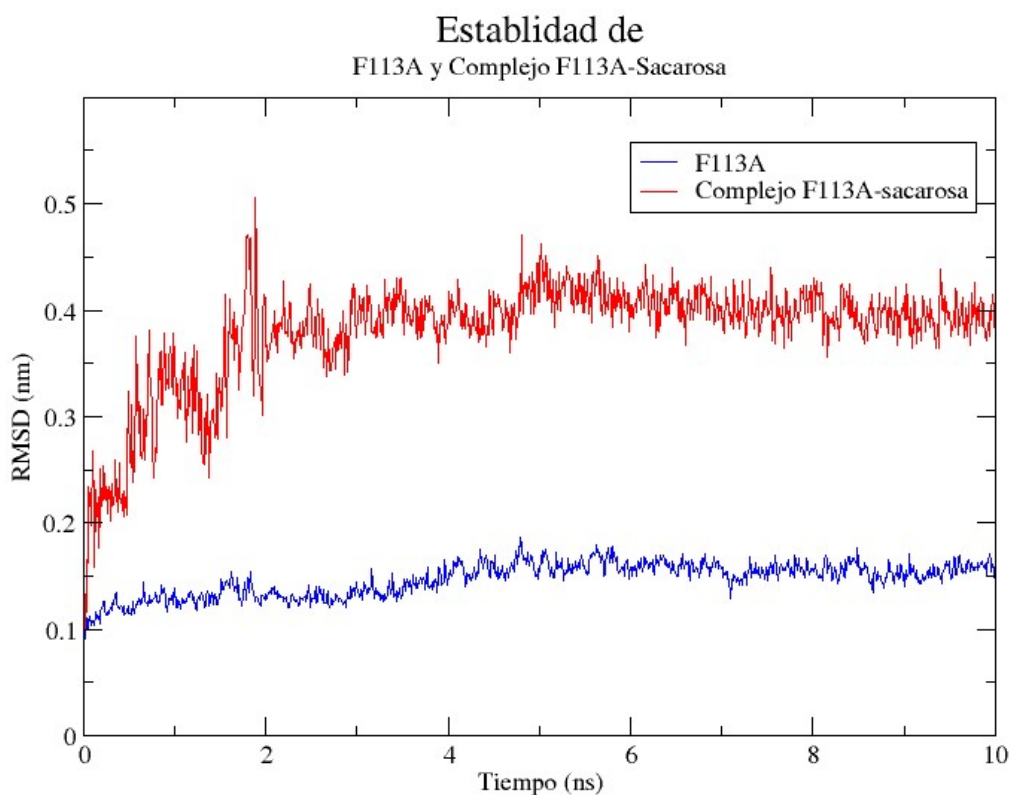
El primer cambio que se observó en la mutante F113A fue en la superficie de la cavidad catalítica (**Figura 16 A**) al modificar la fenilalanina por alanina el espacio de la cavidad aumenta aproximadamente 30 % más en la mutante que en rINU-ISO3 y probablemente permita una mayor interacción en la transferencia de moléculas de fructosa a la molécula de la sacarosa, permitiendo así la producción de los fructooligosacáridos, o también podría afectar de manera negativa y al no haber interacción tipo stacking la sacarosa pierda estabilidad (**Figura 16 B**), salga de la cavidad catalítica y la enzima no presente actividad enzimática.



**Figura 16. A:** Comparación de cavidad catalítica de rINU-ISO3 con una distancia de aproximada de 12.5 Å y la mutante F113A con una distancia aproximada de 13.9 Å, como referencia se tomó el aminoácido Y323 para medir la distancia de la

*cavidad catalítica, B: Interacción de F113 con sacarosa con una distancia de 5.4 Å y la interacción entre A113 con sacarosa con una distancia de 7.1 Å*

La dinámica molecular para la mutante F113A se llevó a cabo bajo las mismas condiciones que la enzima rINU-ISO3, se observó que el RMSD de la enzima comienza con 0.1 nm y a partir de los 4 ns se estabilizó en un valor  $\sim 0.15$  nm, (**Figura 17**, color azul), Este valor es similar al de rINU-ISO3 aunque es importante notar que la mutante tardó ligeramente más tiempo en estabilizarse, probablemente la ausencia de fenilalanina al ser un aminoácido más grande que alanina forma parte importante de las interacciones intermoleculares de la proteína.

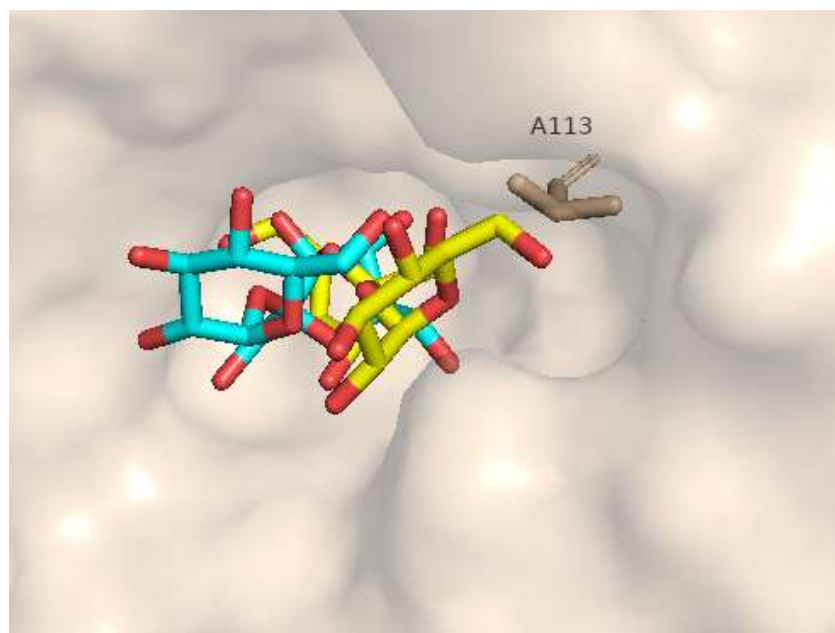


**Figura 17.** RMSD de F113A (Color azul) y el complejo F113A con sacarosa (Color rojo), las dinámicas se llevaron a cabo por 10 ns a una temperatura de 50°C a 1 atm de presión.

El siguiente paso fue evaluar la estabilidad del complejo enzima-sustrato para determinar la energía de unión y comparar los resultados con rINU-ISO3. En la

**Figura 17** en color rojo se observa que el RMSD fluctúa durante los primeros 3 ns sin embargo al parecer a partir de los 4 ns el complejo se mantiene estable.

Una vez que se realizó el cambio de fenilalanina por alanina, el análisis de la sacarosa al tiempo inicial muestra que la glucosa (posición +1) se encuentra orientada hacia la cavidad que se formó por la mutación (**Figura 18**), ya que se pierde la interacción de tipo stacking entre la fenilalanina y la fructosa lo que provoca que la sacarosa se mueva dentro de la cavidad catalítica. A pesar de que la sacarosa se mantiene en el sitio activo durante el tiempo que dura la simulación, la energía de unión con otros aminoácidos como el D53 y la R181 se ve favorecida, mientras que en los residuos restantes la energía de unión se incrementa (**Tabla 11**).



**Figura 18.** Comparación de la posición de sacarosa a tiempo inicial y final (10 ns) en color azul y amarillo respectivamente en la enzima con mutante F113A, la dinámica molecular se llevó a cabo a 50°C, a 1 atm de presión por 10 ns.

El cálculo de la energía de unión del complejo F113A-sacarosa disminuye únicamente para el residuo D53 nucleófilo de la tríada catalítica. Pero todos los demás aminoácidos pierden afinidad por el sustrato ya que la energía de unión aumenta esta mutante podría afectar de manera negativa la actividad catalítica, sin embargo, estos datos *in silico* deben corroborarse con los datos experimentales.

**Tabla 11.** *Energía de unión del complejo F113A – sacarosa obtenidos de la dinámica molecular por 10 ns a 50°C a presión constante*

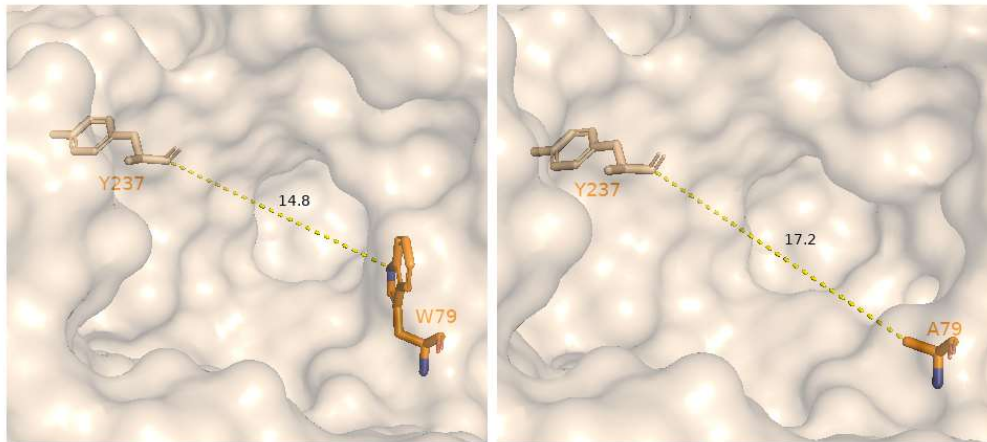
<b>Aminoácidos</b>	<b>Energía de unión del complejo inulinasa-sacarosa (kJ/mol)</b>	<b>Energía de unión del complejo F113A-sacarosa (kJ/mol)</b>
<b>N 52</b>	-6.84	-6.77
<b>D 53</b>	-4.01	-8.03
<b>E 71</b>	-5.13	-3.15
<b>W 79</b>	-10.66	-9.19
<b>F 113</b>	-9.37	-3.81
<b>S 114</b>	-4.12	-2.28
<b>R 181</b>	1.42	-5.17
<b>D 182</b>	-12.32	-6.08
<b>Y 312</b>	-3.57	-3.62
<b>W 335</b>	-9.82	-6.74

➤ Dinámica molecular de W79A

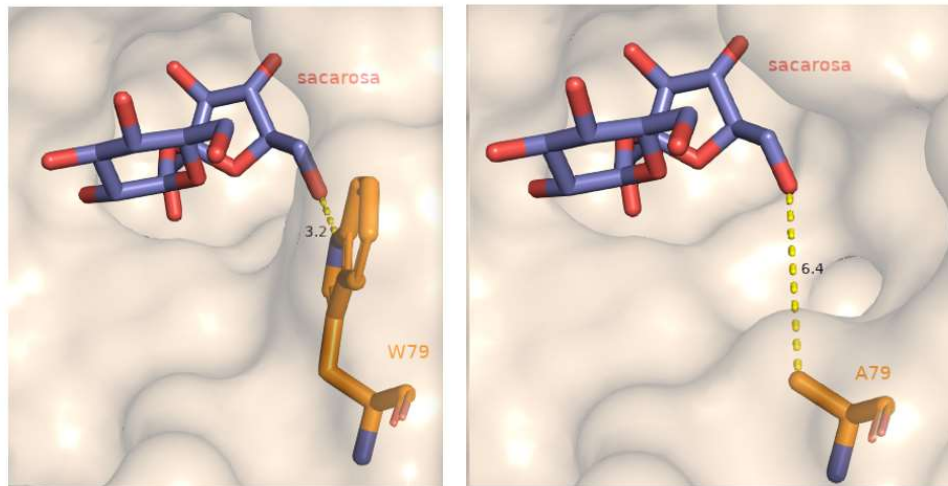
Al igual que en la mutante F113A el primer cambio observable es una modificación en la superficie de la cavidad catalítica (**Figura 19 A**; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) que aumenta aproximadamente un 30% y podría favorecer la estabilidad con un sustrato más grande. Para la formación de fructooligosacáridos en esta mutante se vería afectada la interacción en la posición -1 (fructosa) de la sacarosa (**Figura 19 B**) pues el triptófano forma puentes de hidrógeno con la fructosa y al modificarlo por alanina esta interacción se pierde y podría afectar a la actividad catalítica.



A



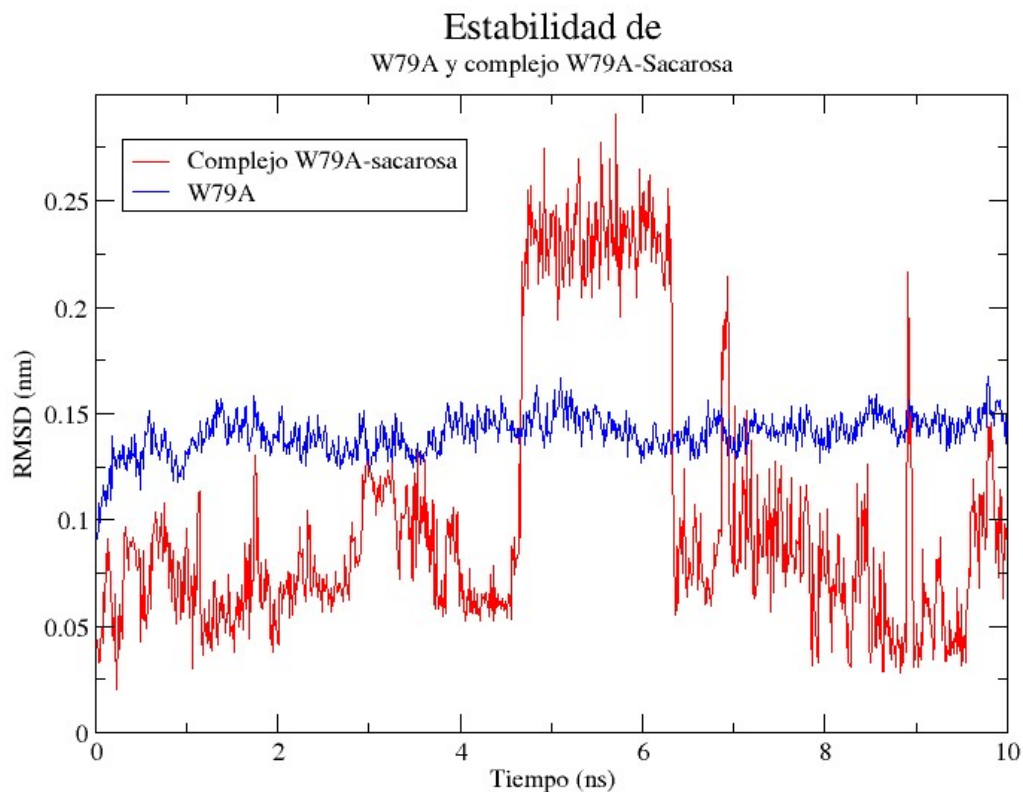
B



**Figura 19. A:** Comparación de la superficie de la cavidad catalítica en el cambio de W79A, se tomó como referencia el mismo aminoácido (Y237) para medir la distancia. **B;** Interacción de W79 con sacarosa con una distancia de 3.2 Å y la interacción entre A79 con sacarosa con una distancia de 6.4 Å

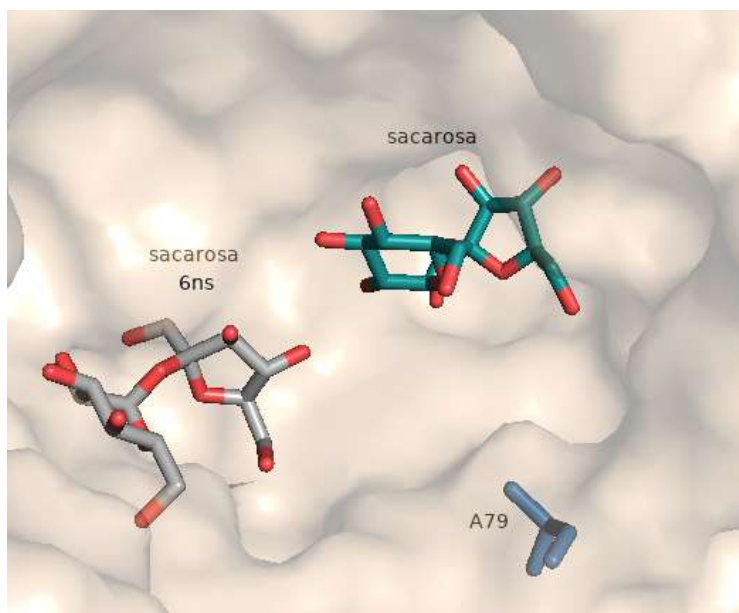
Al realizar la dinámica durante 10 ns, se observó que la mutante W79A se mantiene estable como se observa en la **Figura 20** (color azul). ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. Sin embargo, el complejo enzima-sustrato se ve afectado después de los 5 ns donde se ve un cambio en el RMSD pasando de ~0.05 nm a ~0.25 nm y regresa a ~0.05 nm como se observa en la ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.0 (color rojo). Lo anterior indica que hubo un cambio en la estabilidad del complejo enzima-sustrato, donde el aumento de RMSD corresponde

a la salida de la sacarosa del sitio de unión y el regreso a 0.05 nm indica que ya no hay unión entre la sacarosa y la enzima.



**Figura 20.** *RMSD de W79A (Color azul) y el complejo W79A con sacarosa (Color rojo), las dinámicas se llevaron a cabo por 10 ns a una temperatura de 50°C a 1 atm de presión.*

Por último, se observó en la dinámica que a los 6 ns la sacarosa sale de la cavidad catalítica (**Figura 21**), justo en el tiempo en el que el RMSD fluctúa considerablemente.



**Figura 21.** Comparación de la posición de sacarosa a tiempo inicial y final en color verde y gris respectivamente en la enzima con mutante W79A

En cuanto a la energía de unión de los aminoácidos que interactúan con la sacarosa (**Tabla 12**), se observa un incremento generalizado en la energía de unión, lo que podría suponer se están perdiendo interacciones con el sustrato lo que conlleva a que la sacarosa salga de la cavidad y por tanto afecté la actividad de la enzima, efecto que debe comprobarse experimentalmente.

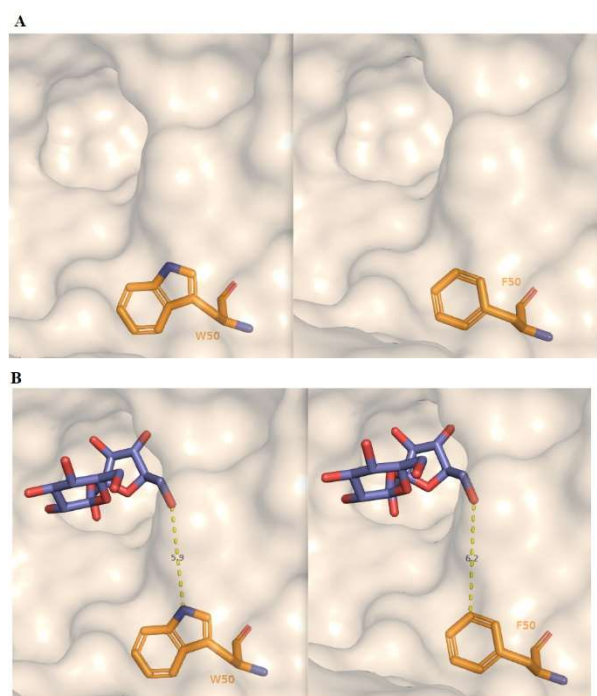
**Tabla 12.** Energía de unión del complejo W79A- sacarosa obtenidos de la dinámica molecular por 10 ns a 50°C a presión constante

Aminoácidos	Energía de unión del complejo inulinasa-sacarosa (kJ/mol)	Energía de unión del complejo W79A-sacarosa (kJ/mol)
<b>N 52</b>	-6.84	-4.70
<b>D 53</b>	-4.01	0.97
<b>E 71</b>	-5.13	-3.46
<b>W 79</b>	-10.77	-2.88
<b>F 113</b>	-9.37	-8.42
<b>S 114</b>	-4.12	-3.07
<b>D 182</b>	-12.32	-2.21

<b>Y 312</b>	-3.57	-2.11
<b>W 335</b>	-9.82	-8.12

➤ Dinámica molecular de W50F

En comparación con las dos mutantes anteriores al hacer la modificación de W50F a nivel superficial no se observan cambios aparentes en la cavidad catalítica tal como se muestra en la **Figura 22**. Por otro lado, en la **Tabla 13**, se observa que la energía de unión aumenta en comparación del complejo rINU-ISO3-sacarosa en prácticamente todos los aminoácidos a excepción de D53 y F113 que parecen ser más afines a la sacarosa con la mutante.



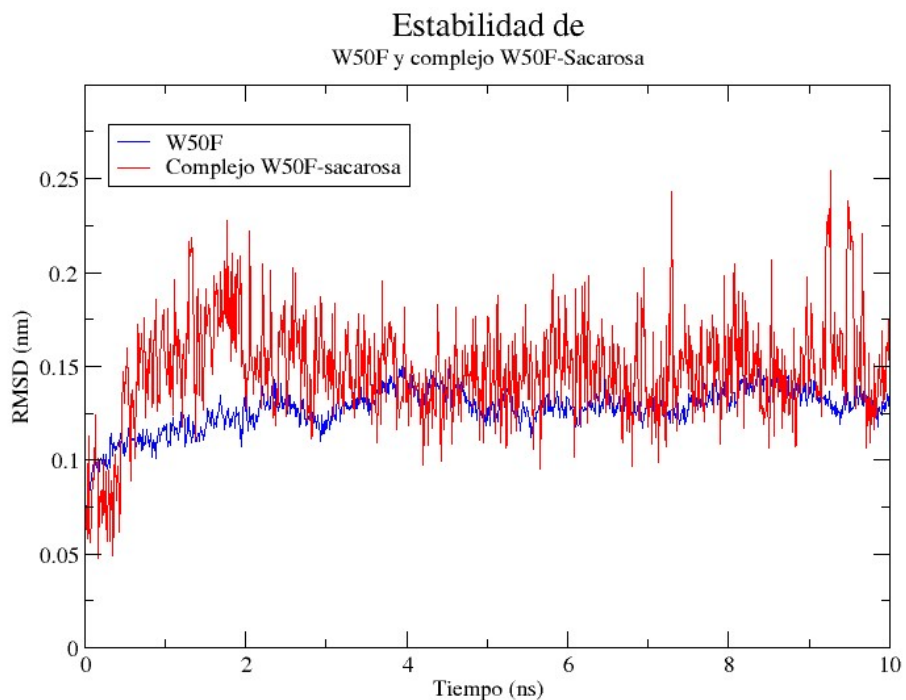
**Figura 22. A:** Comparación de la superficie de la cavidad catalítica en el cambio de rINU-ISO3 mutante W50F, **B:** Interacción entre W50 y sacarosa a 5.5 Å, y la interacción entre F50 y sacarosa a 6.2 Å.

**Tabla 13.** *Energía de unión del complejo W50F - sacarosa obtenidos de la dinámica molecular por 10 ns a 50°C a presión constante*

Aminoácidos	Energía de unión del complejo inulinasa-sacarosa (kJ/mol)	Energía de unión del complejo W50F-sacarosa (kJ/mol)
<b>W 50</b>	-0.86	-1.01
<b>N 52</b>	-6.84	-5.50
<b>D 53</b>	-4.01	-7.56
<b>E 71</b>	-5.13	-3.46
<b>W 79</b>	-10.77	-5.87
<b>F 113</b>	-9.37	-10.14
<b>S 114</b>	-4.12	-5.39
<b>D 182</b>	-12.32	-2.99
<b>Y 312</b>	-3.57	-2.57
<b>W 335</b>	-9.82	-7.63

En cuanto a los resultados de RMSD (**Figura 23** en color azul) de esta dinámica se observa un comportamiento similar a la enzima rINU-ISO3, pues la estructura de la proteína se mantiene estable a partir de 2 ns y hasta los 10 ns se mantiene en 0.125 nm aproximadamente y el complejo enzima-sustrato comienza a estabilizarse a partir del primer nanosegundo y a pesar de que se mantiene en 0.15 nm la línea base está menos definida, probablemente porque al hacer el cambio de triptófano, que es un aminoácido más grande, a fenilalanina las interacciones intermoleculares son menores en la mutante lo que provoca que el RMSD fluctúe más que el complejo

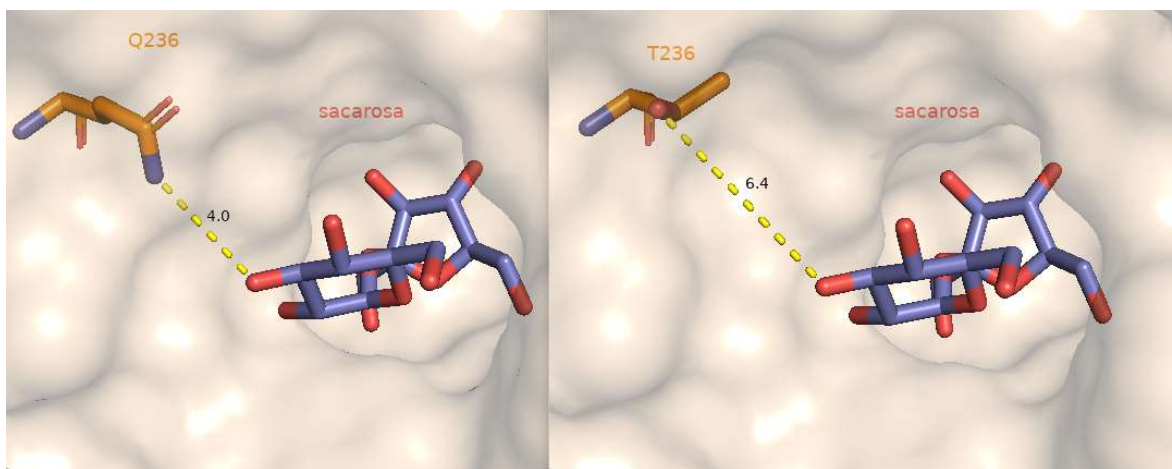
rINU-ISO3-sacarosa (**Figura 23** color rojo; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).



**Figura 23.** RMSD de W50F (Color azul) y el complejo W50F con sacarosa (Color rojo), las dinámicas se llevaron a cabo por 10 ns a una temperatura de 50°C a 1 atm de presión.

➤ Dinámica molecular de Q236T

Como se observa en la **Figura 24** la cavidad catalítica de la enzima es ligeramente más grande debido a que la treonina es un aminoácido más pequeño.



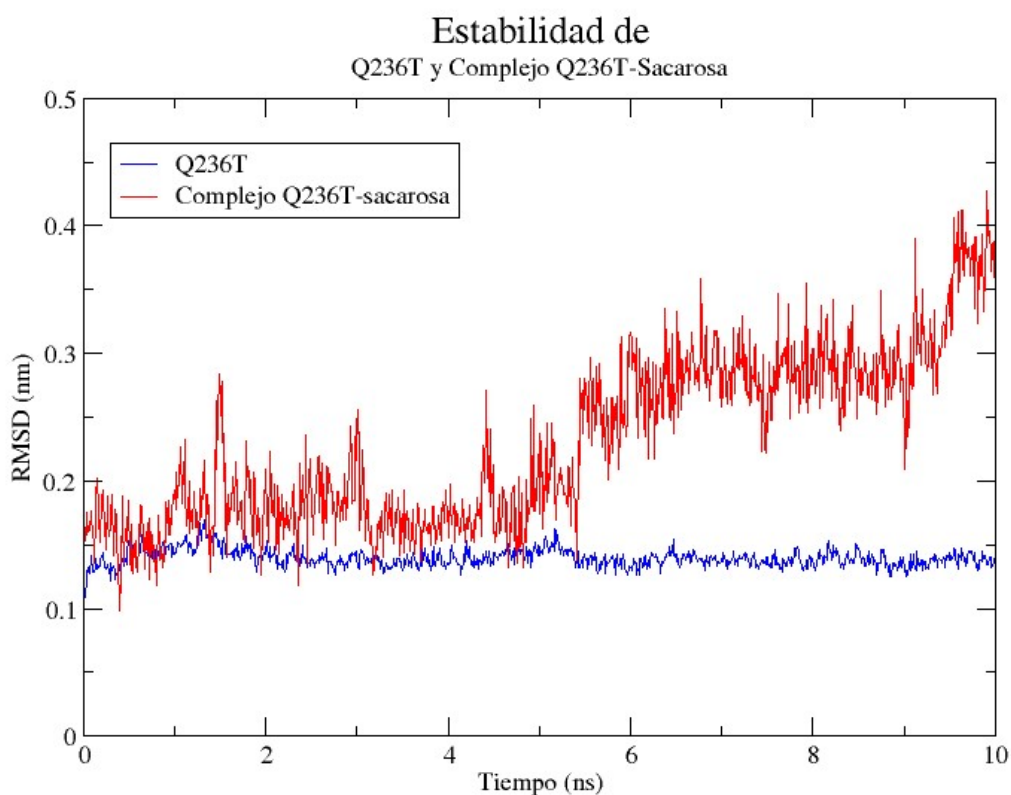
**Figura 24.** Comparación de la superficie de la cavidad catalítica en el cambio de Q236T

Los resultados de la energía de unión del complejo Q236T-sacarosa (**Tabla 14**;[Error! No se encuentra el origen de la referencia.](#)) al igual que las mutantes anteriores aumenta en prácticamente todos los aminoácidos a excepción del nucleófilo D53 que es más afín a la sacarosa, y el RMSD de la enzima es constante en  $\sim 0.14$  nm aproximadamente por lo que la enzima se mantiene estable durante el tiempo de la dinámica (**Figura 25** color azul)

**Tabla 14.** Energía de unión del complejo Q236T - sacarosa obtenidos de la dinámica molecular por 10 ns a 50°C a presión constante

Aminoácidos	Energía de unión del complejo inulinasa-sacarosa (kJ/mol)	Energía de unión del complejo Q236T-sacarosa (kJ/mol)
<b>N 52</b>	-6.84	-5.10
<b>D 53</b>	-4.01	-7.64
<b>Q 71</b>	-5.13	-3.33
<b>W 79</b>	-10.77	-8.76
<b>F 113</b>	-9.37	-6.34
<b>S 114</b>	-4.12	-4.23

<b>D 182</b>	-12.32	-2.59
<b>Y 312</b>	-3.57	-2.38
<b>W 335</b>	-9.82	-0.10



**Figura 25.** RMSD de Q236T (Color azul) y el complejo Q236T con sacarosa (Color rojo), las dinámicas se llevaron a cabo por 10 ns a una temperatura de 50°C a 1 atm de presión.

En cuanto al RMSD del complejo enzima-sustrato (**Figura 25** color rojo) se observa que a lo largo de la dinámica el RMSD pasade ~0.19 nm hasta los ~0.4 nm, es decir, el complejo no logra estabilizarse a través del tiempo, debido a que la afinidad de prácticamente todos los aminoácidos es más baja que en comparación del complejo rINU-ISO3-sacarosa, y probablemente se pierde la interacción de puente de



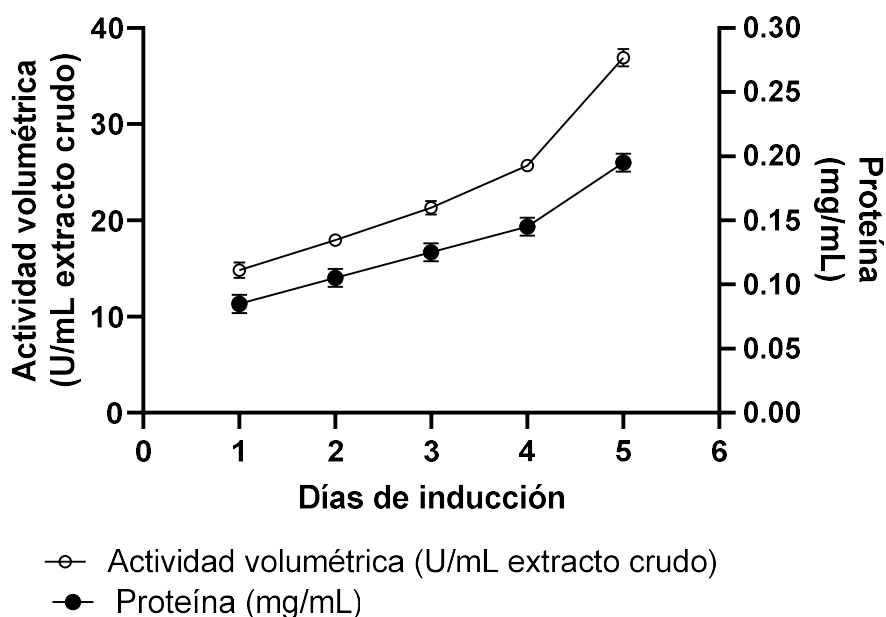
hidrógeno pues la distancia entre la treonina y la sacarosa es de 6.4 Å a diferencia de la glutamina que mantiene una interacción con la sacarosa a una distancia de 4 Å, a pesar de eso la sacarosa se mantiene dentro de la cavidad catalítica durante toda la dinámica a diferencia de W79A.

De acuerdo al análisis *in silico* se determinó que los aminoácidos cercanos a la tríada catalítica que pueden influir en la actividad de transfructosilación son W50, W79, F113 y Q236 y con estos resultados se pasó a la parte experimental para corroborar que los aminoácidos antes mencionados influyen en la actividad de transfructosilación.

Como primer paso se obtuvo la enzima recombinante purificada rINU-ISO3.

## V.2 Expresión de la rINU-ISO3.

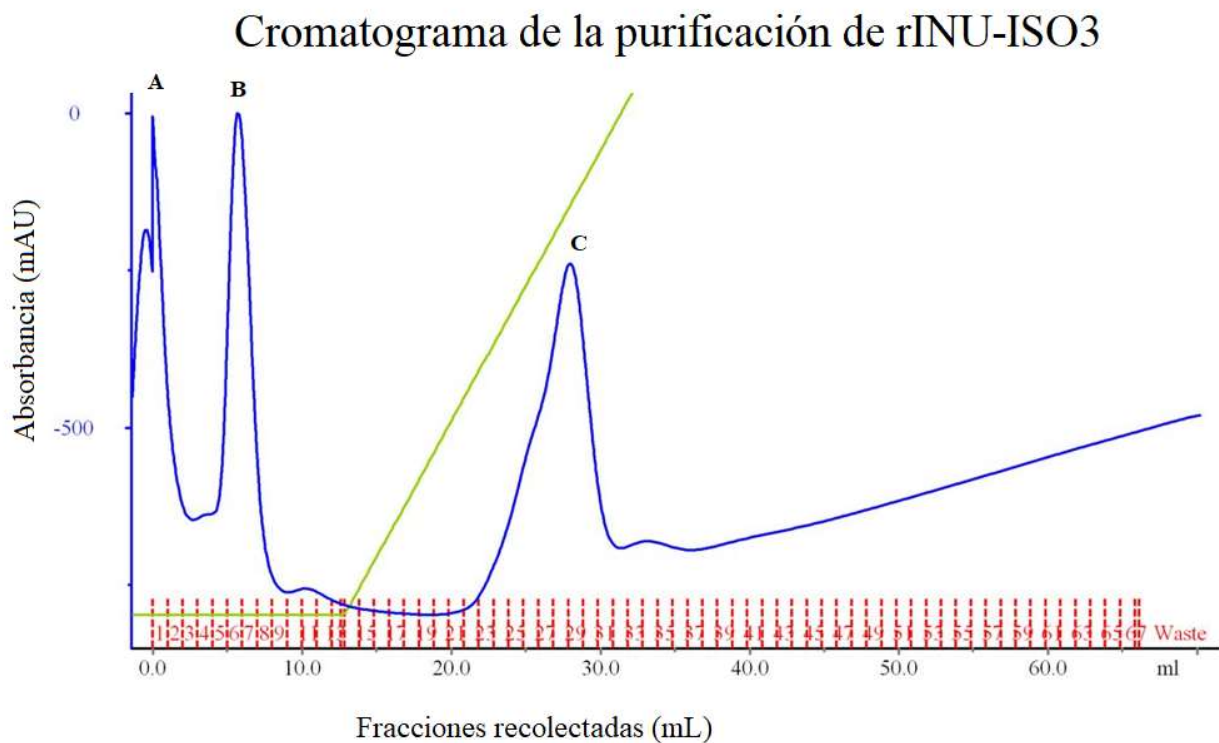
Se realizó el seguimiento en la expresión de la rINU-ISO3 a través de 5 días de inducción con metanol para verificar que la enzima se estaba expresando adecuadamente ( **Figura 26**).



**Figura 26.** Seguimiento de la expresión de la rINU-ISO3

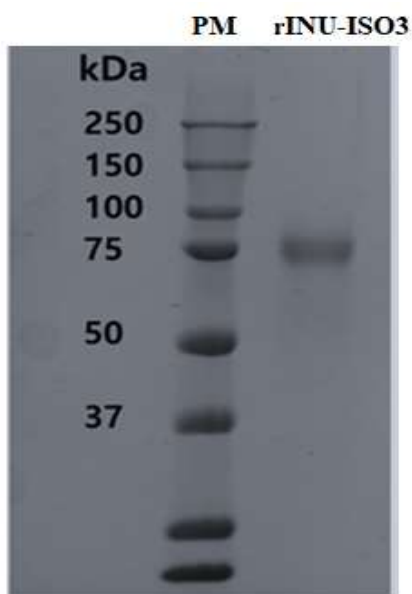
Después de los 5 días de inducción, rINU-ISO3 se purificó utilizando una columna de afinidad, ya que la enzima cuenta con una etiqueta de 6 histidinas en el extremo carboxilo terminal.

La separación de las proteínas se puede observar en la **Figura 27** en la que hay 3 señales; Señal A: los primeros 2 mL, B: entre 6 y 7 mL y C: de 24 a 30 mL. Con la finalidad de determinar la fracción con la actividad inulinasa, a cada señal se le midió la actividad enzimática con sacarosa 120 mM en buffer de acetatos 50 mM pH 5.5 durante 10 minutos a 60°C. La cuantificación del producto de la reacción, fructosa, se realizó a través del método de DNS, la única señal que mostró actividad fue el pico C, de esta manera se tomaron las fracciones de la 24 a la 29 con un total de 12 mL.



**Figura 27.** Cromatograma obtenido del paso de la purificación del sobrenadante de la enzima recombinante, la purificación arrojó tres señales (A, B y C), además en color verde se observa el gradiente de Imidazol que se utilizó en la purificación. C es la proteína de interés.

Para verificar la pureza de las fracciones recolectadas de la columna de afinidad, se realizó una electroforesis SDS-PAGE (**Figura 28**). Se observa que la muestra se encuentra pura ya que sólo se puede apreciar una sola banda en el carril rINU-ISO3, con un peso molecular aproximado de 85.2 kDa. Se debe tomar en cuenta que la electroforesis SDS-PAGE nos permite estimar el peso del monómero ya que la enzima se encuentra completamente desnaturalizada. Sin embargo, en investigaciones previas del laboratorio se determinó que la enzima está glicosilada y es un dímero con peso molecular de 256 kDa, determinado por cromatografía de exclusión molecular.



**Figura 28.** Gel de poliacrilamida al 10% SDS-PAGE, teñido con Azul de Coomassie, En el carril PM se encuentra el marcador de peso molecular, carril rINU-ISO3: Enzima recombinante purificada.

Para evaluar la eficacia de la purificación se construyó una tabla de purificación en donde se concentran los datos del paso por la columna de afinidad y un paso posterior de diálisis y concentración (**Tabla 15**). Se puede observar que, a pesar de sólo emplear una técnica cromatográfica, y que en el paso de diálisis y concentración hubo pérdida de proteína debido a que ésta se quedó pegada a la membrana del amicon, el rendimiento de la purificación es de 81%, obteniéndose una concentración total de enzima de 0.022mg con una actividad específica de 185 U/mg proteína.

**Tabla 15.** *Tabla de purificación de la enzima recombinante*

Paso	Volumen (mL)	Proteína total (mg)	Actividad enzimática (U)	Actividad específica (U/mg proteína)	Veces de purificación	Rendimiento
Extracto crudo	50	0.413	3.3	8	1	100
Columna de afinidad	12	0.77	3.6	47	6	91
Diálisis y concentración	4	0.022	4.1	185	23	81

La reacción de hidrólisis se llevó a cabo con sacarosa 120 mM en buffer de acetatos 50 mM pH 4.5 a 60°C por 15 min a 450rpm

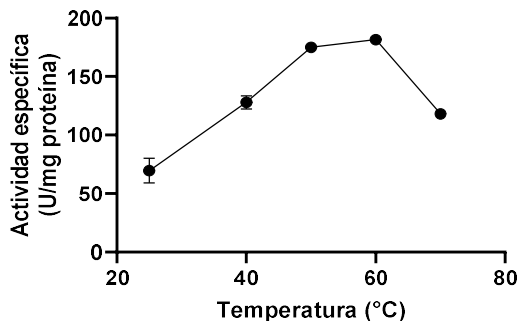
### V.3 Análisis de la actividad enzimática

#### Efecto de la temperatura y pH en la actividad hidrolítica.

Para tener un punto de partida para realizar la reacción de transfructosilación, se determinaron las mejores condiciones de temperatura y pH para la reacción de hidrólisis. Se realizaron reacciones con sacarosa 120 mM. Para determinar la temperatura óptima las reacciones se llevaron a cabo en buffer de acetatos 50 mM a pH 4.5, 450 rpm por 15 min. Para la determinación de pH óptimo las reacciones se llevaron a cabo a 60°C y 450 rpm por 15 min, en buffer de acetatos 50mM de pH 3.5 a 5.5 y buffer de fosfatos 50mM para pH 6.5 y 7.5 (**Figura 29**).

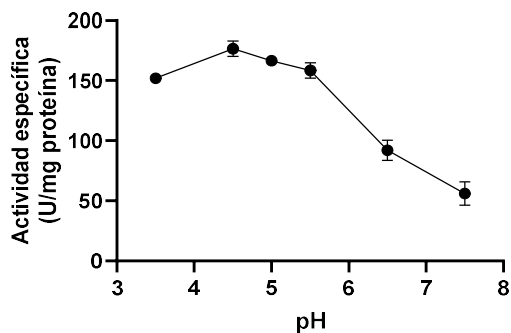
**A**

**Efecto de la temperatura en la actividad enzimática**



**B**

**Efecto del pH en la actividad enzimática**



**Figura 29.** Efecto de la temperatura (A) y pH (B) en la reacción de rINU-ISO3 sobre la hidrólisis de sacarosa. Las reacciones se llevaron a cabo a pH 4.5 con sacarosa 120 mM, las reacciones se llevaron a cabo a 60°C con sacarosa 120 mM

Como se observa en la **Figura 29**, se observa que no hay una gran diferencia entre 50°C y 60°C con una actividad enzimática de 175 U/mg de proteína y 181.5 U/mg, por lo tanto, se decidió trabajar en la temperatura de 50°C para minimizar la energía que se requiere para realizar las reacciones, por otro lado, la enzima presenta una actividad máxima desde un pH de 3.5 hasta 5.5.

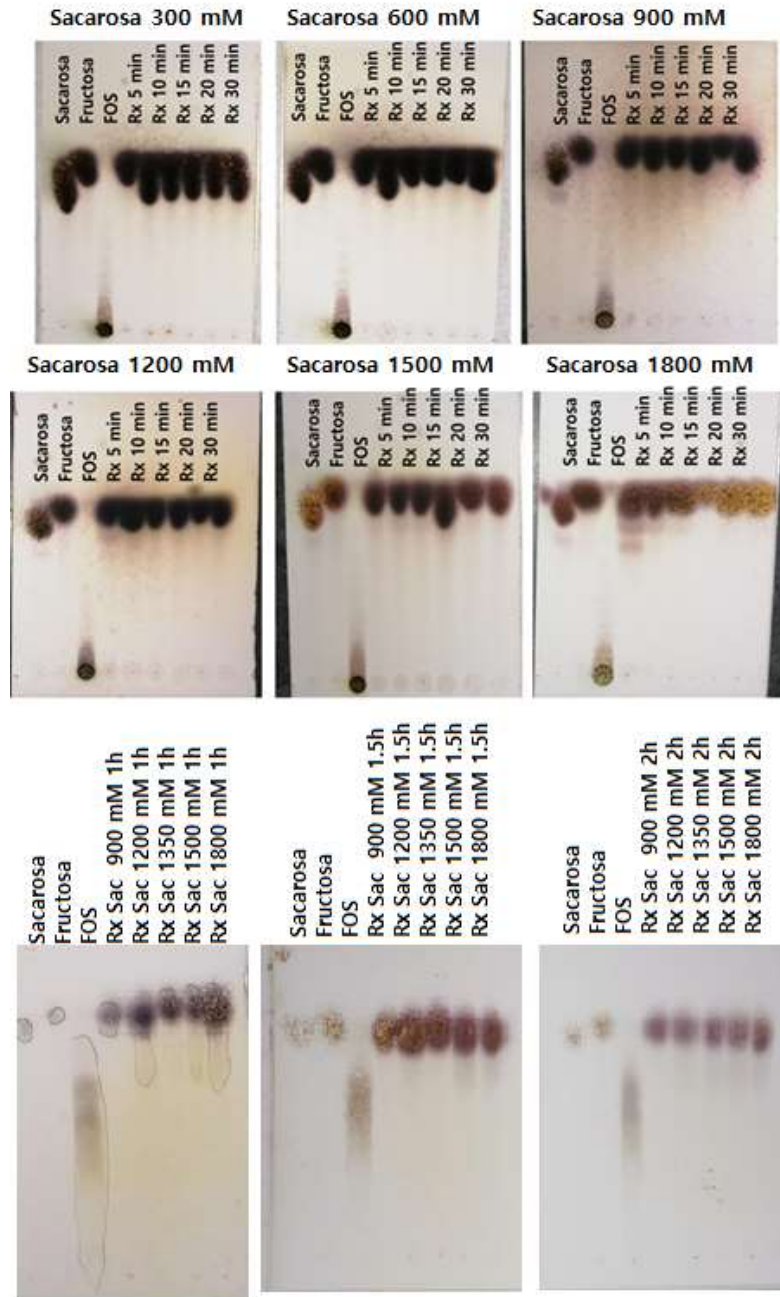
Los resultados obtenidos son similares a otras inulinasas de *K. marxianus* reportadas en la literatura que presentan una máxima actividad enzimática en un rango de pH entre 3.5 y 5.5 y un rango de temperatura entre 45 y 60°C (Arrizon et al., 2011; Cazetta et al., 2005; Jain et al., 2012; Trapala et al., 2020).

Marc De Maeyer y colaboradores (Yuan et al., 2012) encontraron que las diferencias entre los pH óptimos pueden variar dependiendo del sustrato y los estados de ionización de los aminoácidos presentes en el sitio activo.

#### Actividad de transfructosilación

Una vez determinadas las condiciones óptimas para la hidrólisis se decidió realizar las reacciones a pH 4.5 y 60°C (unas de las mejores condiciones de reacción para sacarosa) para la actividad de transfructosilación tomando en cuenta diferentes tiempos de reacción (5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 90 y 120 min) y diferentes concentraciones de sacarosa (300 a 1800 mM), con una actividad volumétrica de 34 U/mL, posteriormente las reacciones se detuvieron por temperatura a 90°C por 10 min y se hicieron diluciones para poder observar los productos en TLC.

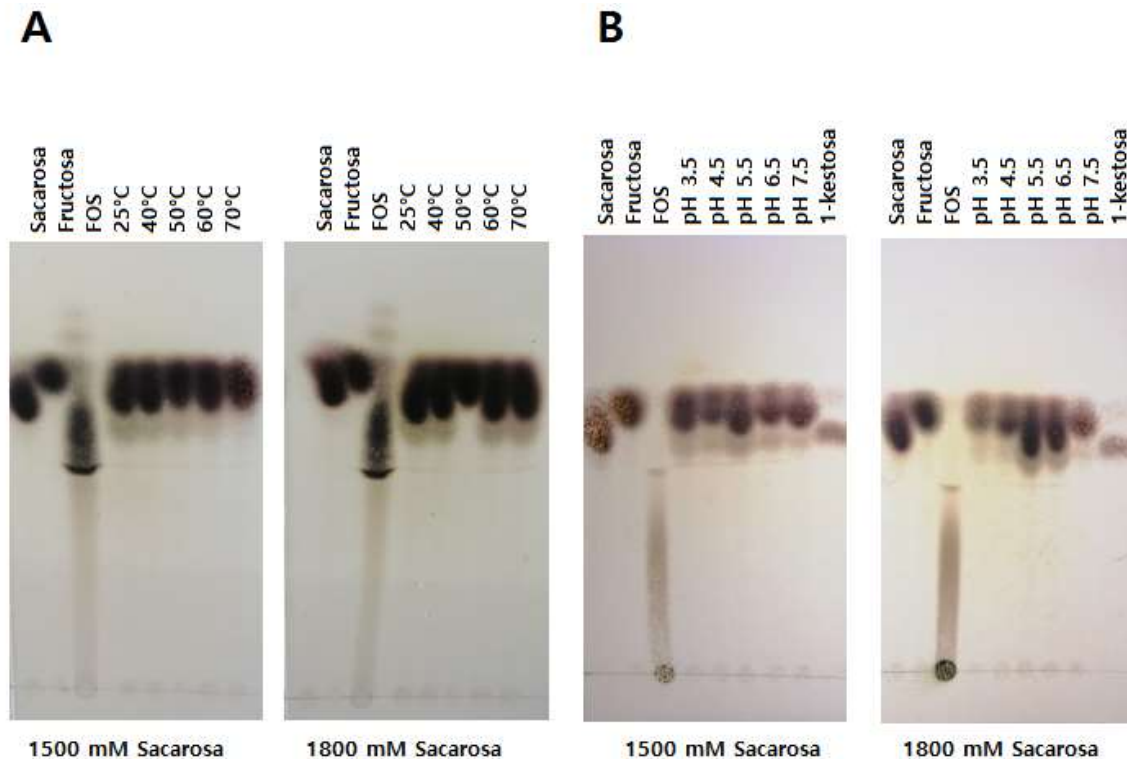
En la **Figura 30**, se pueden observar los productos de reacción donde se utilizaron diversas condiciones para verificar que efectivamente la enzima recombinante (rINU-ISO3) tiene actividad de transfructosilación. En las reacciones de 20 y 30 min se logran apreciar señales por debajo de la sacarosa que pueden ser productos de transfructosilación, sin embargo, pasando los 40 min los productos se observan con menor intensidad lo que podría indicar que la enzima está hidrolizando los fructooligosacáridos. En cuanto a la variación en concentración de sacarosa se alcanza a observar un barrido que posiblemente FOS a partir de 1500 mM de sacarosa.



**Figura 30.** *Determinación de condiciones óptimas de concentración de sustrato y tiempos de reacción para la transfructosilación. Los controles de sacarosa, fructosa y FOS se colocaron en una concentración de 1% m/v en buffer de acetatos.*

Una vez determinada la concentración de sacarosa adecuada (1500 mM) para la reacción de transfructosilación, se realizaron reacciones a diferentes valores de pH y de temperatura fijando 50°C como temperatura para analizar los diferentes valores de pH y un pH de 4.5 para analizar los intervalos de temperatura. Como se observa

en la **Figura 31**, se obtienen productos de reacción (bandas) por debajo de las marcas de sacarosa y fructosa, en prácticamente todas las temperaturas siendo más marcado en el intervalo de 25-50°C. De igual manera, se observa el mismo barrido en todas las reacciones a los diferentes intervalos de pH a 50°C

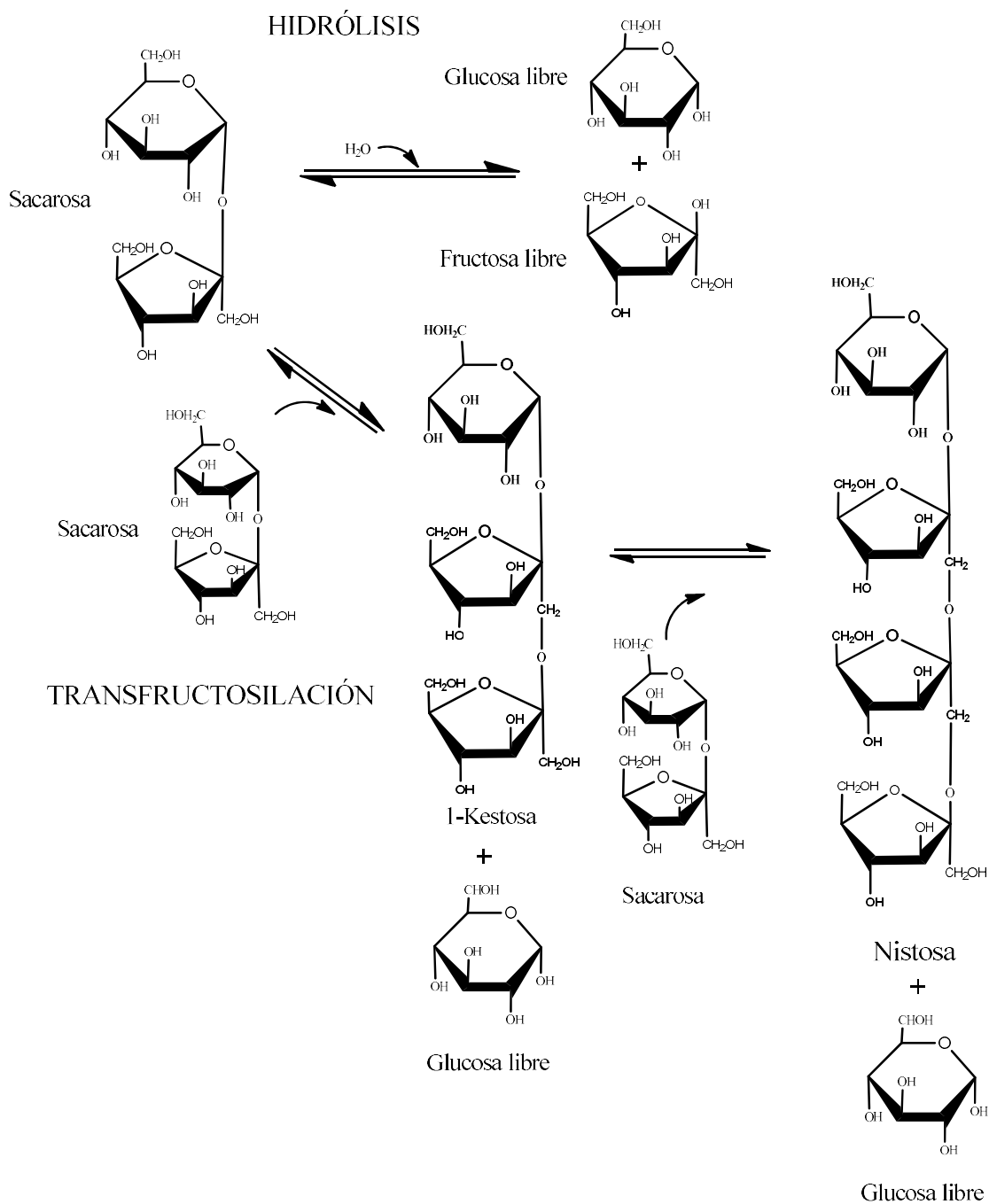


**Figura 31.** Efecto de temperatura y pH para la transfructosilación, **A:** Reacciones de transfructosilación a pH 4.5 a diferentes temperaturas desde 25°C hasta 70°C, **B:** reacciones de transfructosilación a 50°C con distintos valores de pH desde 3.5 hasta 7.5. Las reacciones se llevaron por 20 min

Determinación de la relación hidrólisis-transfructosilación.

Para comparar el efecto en la actividad enzimática tanto hidrolítica como de transfructosilación de las mutaciones a realizar en la rINU-ISO3 es necesaria la determinación de la relación hidrólisis-transfructosilación de las reacciones con rINU-ISO3. Para esto se cuantificó la cantidad de fructosa y glucosa libres de las reacciones anteriores, asumiendo que la glucosa libre es la sacarosa consumida, la fructosa es producto de la hidrólisis y lo que resta es la fructosa transferida a FOS tal como se muestra en la **Figura 32**.





**Figura 32.** Esquema de reacción para la transfructosilación a partir de sacarosa. (Raga-Carbajal et al., 2021)

De esta manera se determinó la relación hidrólisis/transfructosilación con las siguientes ecuaciones:

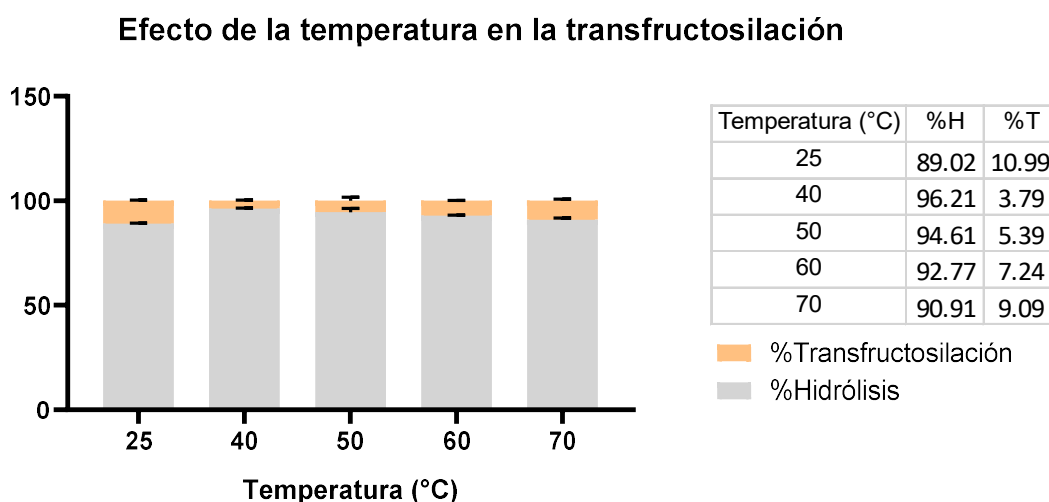
$$\% \text{Hidrólisis} = \frac{\text{Fructosa}_{\text{libre}}}{\text{Glucosa}_{\text{libre}}}$$

$$\% \text{Transfructosilación} = \frac{\text{Glucosa}_{\text{libre}} - \text{Fructosa}_{\text{libre}}}{\text{Glucosa}_{\text{libre}}}$$

Para determinar la concentración de cada producto se realizaron curvas patrón de glucosa, fructosa y sacarosa de 3 a 20 g/L mediante HPLC (Anexo A, **Figura A. 3**).

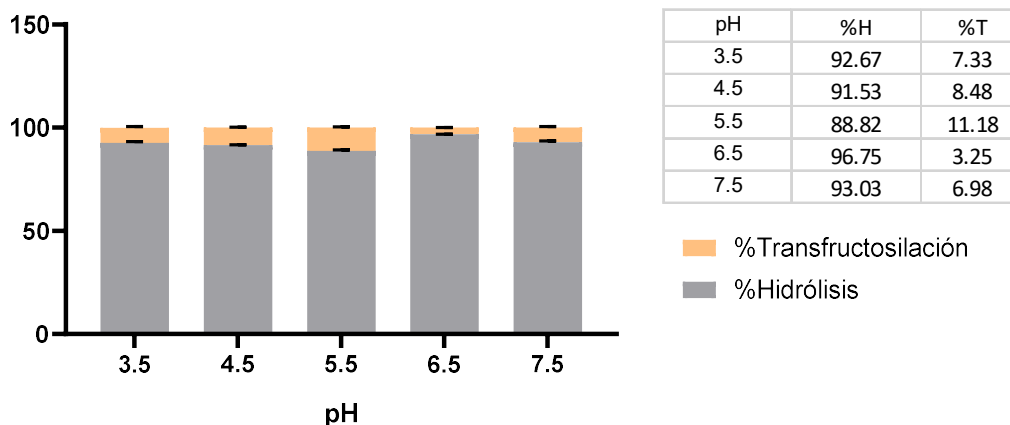
De acuerdo a los resultados cualitativos que se observaron en la cromatografía de capa fina se decidió cuantificar el efecto de pH y temperatura en la actividad de transfructosilación de la siguiente forma; para el efecto de pH se llevaron a cabo las reacciones con buffer de acetatos 50 mM para pH de 3.5 a 5.5 y buffer de fosfatos 50 mM para pH 6.5 a 7.5, una temperatura constante de 25°C con 1500 mM de sacarosa y una actividad enzimática de 34 U/mL por 20 min a 450 rpm, para medir el efecto de la temperatura se decidió realizar las reacciones con buffer de acetatos 50 mM a pH 5.5, manteniendo la actividad enzimática, el tiempo y las rpm de igual forma que para el efecto de pH.

Posteriormente se cuantificó la cantidad de fructosa, sacarosa y glucosa en el sistema a través de HPLC.



**Figura 33** . Efecto de la temperatura en la relación hidrólisis/transfructosilación de rINU-ISO3. Las reacciones se realizaron con buffer de acetatos 50 mM a pH 5.5 con sacarosa 1500 mM con una actividad volumétrica de rINU-ISO3 de 34 U/mL, por 20 min, 450 rpm.

### Efecto del pH en la transfructosilación



**Figura 34.** Efecto del pH en la relación hidrólisis/transfructosilación de INU-ISO3. Las reacciones se realizaron a 25°C con sacarosa 1500 mM con una actividad volumétrica de rINU-ISO3 de 34 U/mL, por 20 min, 450 rpm.

En la **Figura 33** y **Figura 34** se puede observar que la temperatura óptima para la reacción de transfructosilación es a 25°C y a pH 5.5 por un tiempo de reacción de 20 min, con un 11% de transfructosilación. De acuerdo a la literatura, para enzimas que pertenecen a la familia glicosil-hidrolasas, se pueden encontrar rangos de pH y temperatura óptimos entre 4.5 y 6.5 y entre 40 y 60°C. El pH tiene un fuerte impacto en el estado de ionización de los aminoácidos del sitio activo y puede afectar la estructura primaria y secundaria de la enzima y por consecuencia la actividad. En la literatura se encontró que un pH alrededor de 5.5, es óptimo para la producción de FOS de cadena corta como kestosa y nistosa, en invertasas de *A. japonicus*, *S. cerevisiae*, *A. niger*, levansacarasa de *B. subtilis*, (Martins et al., 2019) y pH 5 y 6 para inulinasas de *K. marxianus* (Santos, 2007)

Cabe mencionar que los fructanos producidos por enzimas que pertenecen a la familia GH, son principalmente fructooligosacáridos compuestos por 1- y 6- kestosa (DP 3), nistosa (DP 4) y 1-fructofuranosil nistosa (DP 5) (Ramos et al., 2019).

La temperatura de reacción juega un papel importante en la relación hidrólisis/transfructosilación, en 2011 Tian Feng y colaboradores determinaron en

una levansacarasa que la relación transfructosilación e hidrólisis dependían de la temperatura de reacción; mientras que en un rango de 15 a 30°C la transfructosilación se veía favorecida a 45 y 50°C la actividad hidrolítica era máxima.

En la literatura predominan los reportes a temperaturas bajas,, por ejemplo para levansacarasa de *Pseudomonas syringae* la temperatura óptima es a 18°C y para la levansacarasa de *Zymomonas mobilis* se reporta una temperatura óptima de 15°C (Tian et al., 2011). También en el 2022 Ritumbhara Choukade y Kango Naveen reportaron la producción de fructooligosacáridos a partir de una fructosiltransferasa de *Aspergillus tamarri* a 28.4°C, pH 7.0 y una concentración de 1500 mM de sacarosa (Choukade & Kango, 2022).

A diferencia de las inulinasas obtenidas de *K. marxianus* var. *bulgaricus* por Santos y Maugeri y de *K. marxianus* NRRL Y-7571 por Risso y colaboradores, que tienen una temperatura óptima de 50 y 40°C respectivamente, RINU-ISO3 presenta sus mejores condiciones a 25°C (Risso et al., 2012b, 2012a; Santos & Maugeri, 2007)

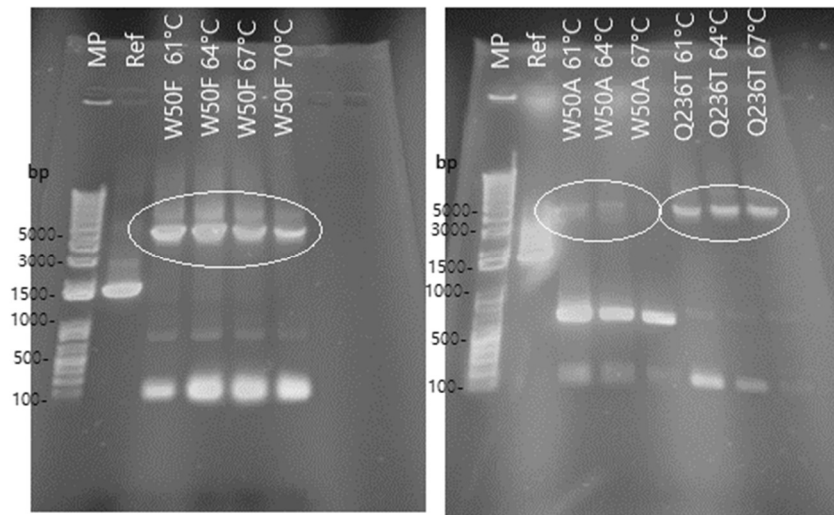
Una vez que se verificó que la enzima rINU-ISO3 es capaz de realizar la reacción de transfructosilación, se llevó a cabo la obtención de las mutantes propuestas por el análisis *in silico*.

#### V.4 Obtención de las mutantes de rINU-ISO3

Se realizó la amplificación del gen INU-ISO3 con los cebadores de las mutantes que faltaban por construir para determinar la mejor temperatura de amplificación y poder obtener el gen con la mutación para posteriormente mandarlo a secuenciar.

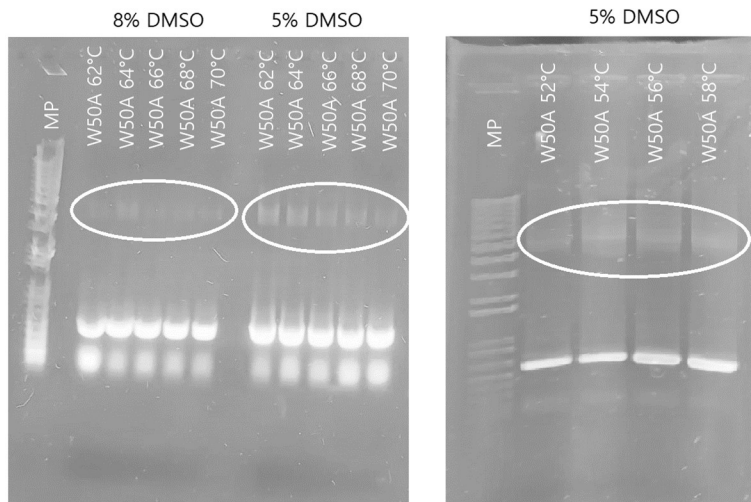
En las **Figura 35** se observan las bandas, marcadas por un ovalo blanco, por arriba de 5000 pb, que es la suma de las pares de bases totales del plásmido pPICZαB (3600 pb) y el gen INU (1700 pb), se probaron diferentes temperaturas en un rango de 61° a 67°C. Las mutantes W50F y Q236T se lograron amplificar en las cuatro temperaturas que se probaron, para W50A la amplificación no fue exitosa y se observaron productos inespecíficos a 100 pb se observan abortos de la amplificación y 700 pb puede ser productos de PCR obtenidos por la degradación de los primers. Sin embargo, se buscó repetir la amplificación probando más

temperaturas y variando la concentración de DMSO con la intención de mejorar las condiciones de amplificación.



**Figura 35.** Amplificación de plásmido para las mutantes W50F, W50A y Q236T a distintas temperaturas; **MP:** Marcador de DNA, **Ref:** Gen INU-ISO (1700 bp), **Mutantes: W50F, W50A y Q236T:** Plásmido pPICZαB (3600 bp).

Se realizó la amplificación para W50A con diferentes concentraciones de DMSO (5 y 8%) y distintas temperaturas en un rango de 52°C a 70°C para disminuir la presencia de productos inespecíficos, donde se tomó la concentración de 5%DMSO a una temperatura de 54°C (**Figura 36**).



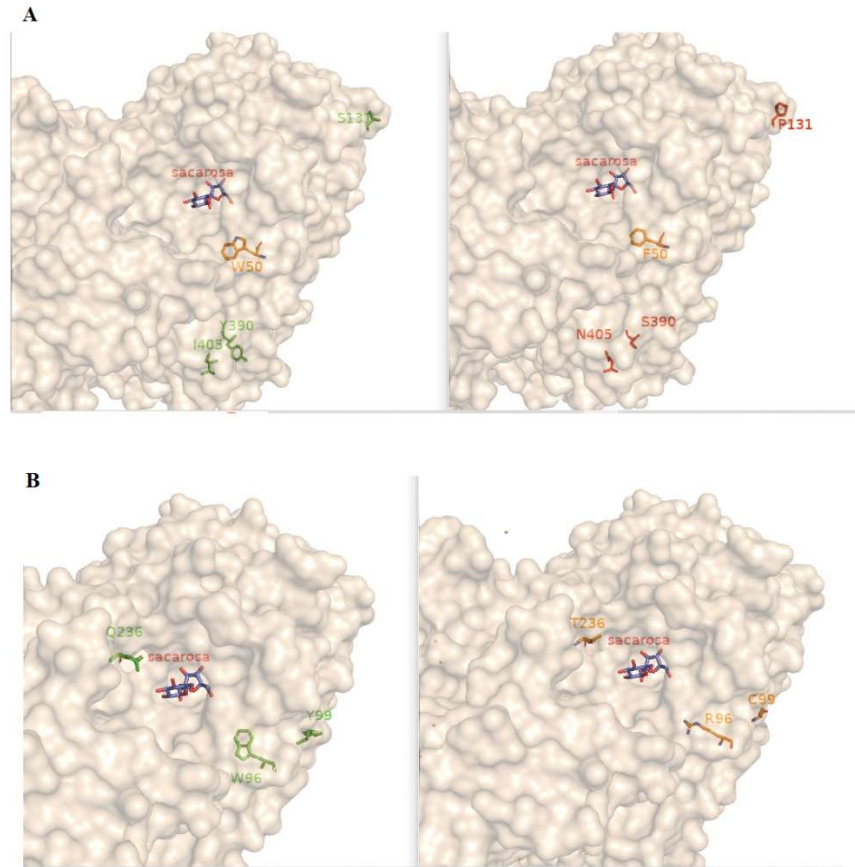
**Figura 36.** Amplificación de plásmido para mutante W50A con diferentes concentraciones de DMSO y temperaturas. **MP:** Marcador de DNA, **W50A** con diferentes concentraciones de DMSO y temperaturas de amplificación.

Una vez amplificado el plásmido con el gen rINU-ISO3 y las diferentes mutantes, se purificaron y se mandaron a secuenciar al laboratorio Macrogen Inc. Después los resultados de la secuenciación se analizaron con la herramienta ExpASy (<https://web.expasy.org/translate/>).

De acuerdo a los análisis de secuenciación para W50F de los 6 plásmidos que se enviaron sólo 1 tenía la mutación W50F, pero tenía tres mutaciones más en S131P, Y390s e I405N, a pesar de que no se encuentran cerca de la cavidad catalítica (**Figura 37 A**), se descartó la mutante para evitar que los resultados se alteraran por la presencia de más modificaciones en la enzima.

Al igual que W50F de los 8 plásmidos que se secuenciaron para Q236T se obtuvo un plásmido que tenía la mutante pero también contaba con dos mutantes más, W96R y Y99C, tampoco se encuentran cerca de la cavidad catalítica (**Figura 37 B**), pero se descartó la mutante porque sólo buscábamos una sola modificación.

Por último, para los plásmidos secuenciados de W50A no se obtuvieron colonias positivas por lo tanto también se descartó.



**Figura 37.** Ubicación de las mutantes adicionales que se encontraron en los plásmidos secuenciados para W50F y Q236T, **A:** Para la mutante W50F se encontraron las mutantes S131P, Y390s e I405N identificadas con color verde y rojo respectivamente, **B.** Para la mutante Q236T, se encontraron las mutantes W96R y Y99C, identificadas con color verde y rojo respectivamente.

Debido a que los plásmidos secuenciados presentaban otras mutaciones además de la mutación deseada se decidió trabajar con las mutantes F113A y W79A. Estos plásmidos sólo cuentan con la mutante que buscamos estudiar (Trapala, 2022), por lo tanto, se procedió a realizar la transformación de *E. coli* y posteriormente de *Pichia pastoris* para la expresión y obtención de estas enzimas.

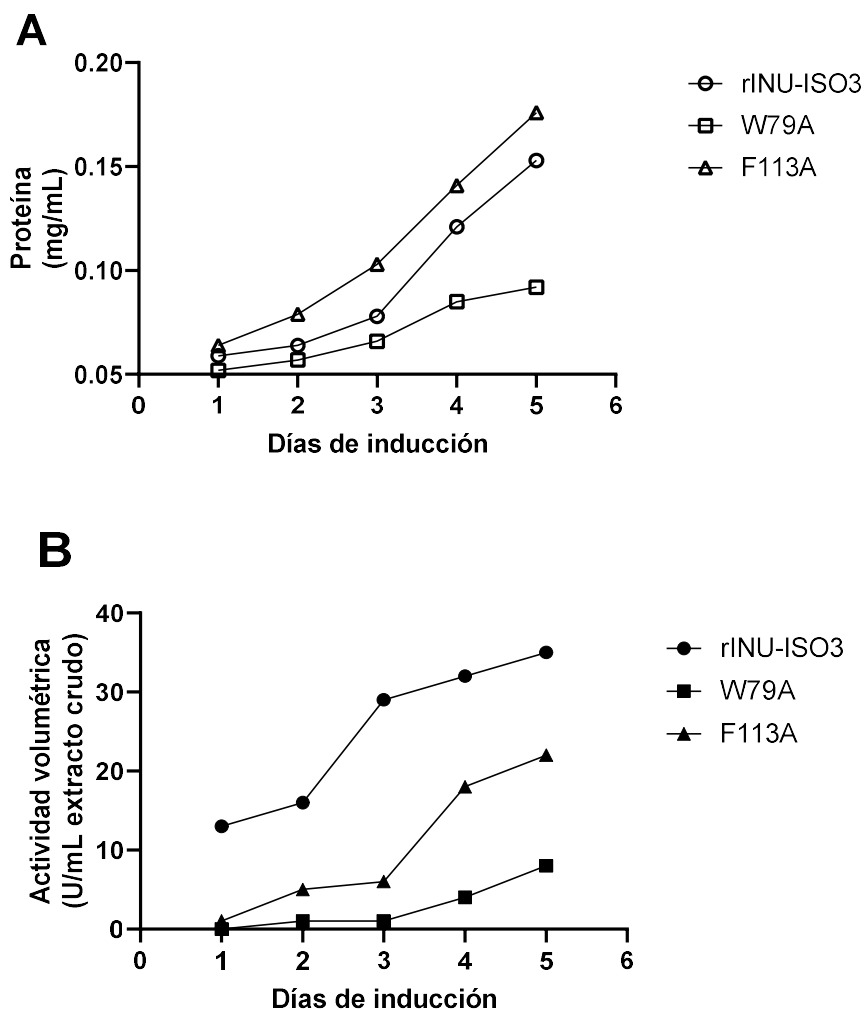
#### Seguimiento de la expresión de las mutantes W79A y F113A

Se monitoreo la expresión de las mutantes W79A y F113A para compararla con respecto a rINU-ISO3, como se observa en la **Figura 38A** la cantidad de proteína que se obtiene de las enzimas es similar. Sin embargo, para W79A no se observó

la actividad hidrolítica en los primeros dos días de inducción (**Figura 38B**), es decir, esta mutante está afectando a la actividad enzimática en un 83% (**Tabla 16**). Este resultado concuerda con lo observado en la dinámica molecular en donde el complejo W79A-sacarosa no es estable y la sacarosa sale de la cavidad catalítica a partir de los 6 ns. Esto se debe a que se pierde la interacción de puentes de hidrógeno del triptófano con el sustrato y al modificarse por alanina se incrementa la energía de unión de los aminoácidos con los que interactúa el sustrato, eso explicaría porque la actividad enzimática de W79A disminuyó.

En el caso de F113A a pesar de que la cantidad de proteína que se obtuvo en el día 5 de inducción fue mayor que rINU-ISO3 se observa una disminución de 39% (**Tabla 16**) en la actividad enzimática, como se observó en la dinámica molecular el complejo F113A-sacarosa mantenía un RMSD estable a partir de los 4 ns y la energía de unión aumentó en la mayoría de los aminoácidos que interactúan con el sustrato, experimentalmente se comprueba que se afectó de forma negativa la actividad como se había planteado con los datos *in silico*.





**Figura 38.** Seguimiento de expresión de enzimas rINU-ISO3, W79A y F113A. **A:** Cantidad de proteína a través de los días de inducción con metanol; **B:** Actividad volumétrica a través de los días de inducción con metanol.

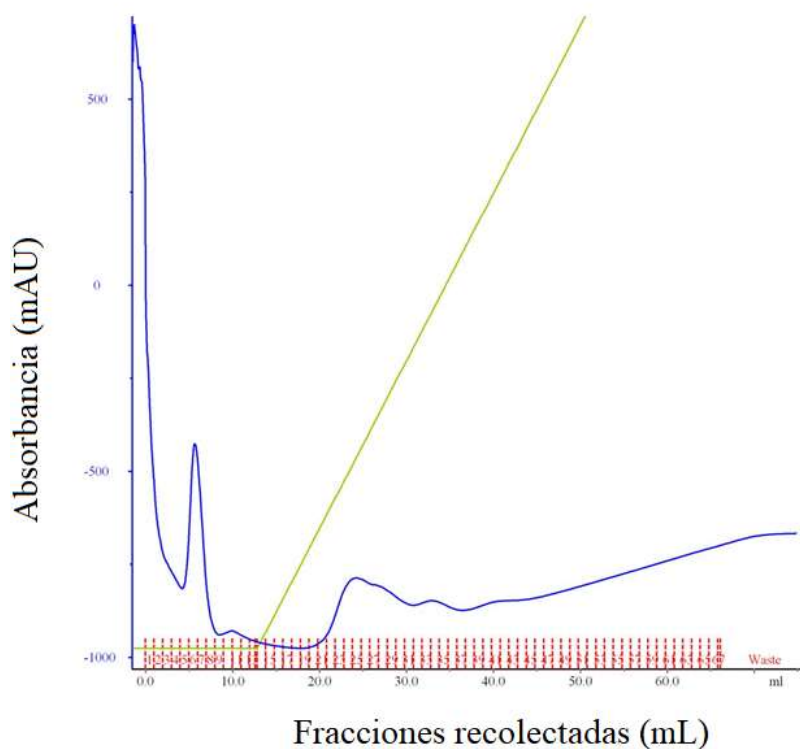
**Tabla 16.** Seguimiento de expresión de enzimas

Días de inducción	Proteína (mg/mL)			Actividad volumétrica (U/mL)		
	rINU-ISO3	W79A	F113A	rINU-ISO3	W79A	F113A
1	0.059	0.052	0.064	13	0	1
2	0.064	0.057	0.079	16	1	5
3	0.078	0.066	0.103	29	1	6
4	0.121	0.085	0.141	32	4	18
5	0.153	0.092	0.176	35	8	22

Purificación de las mutantes W79A y F113A.

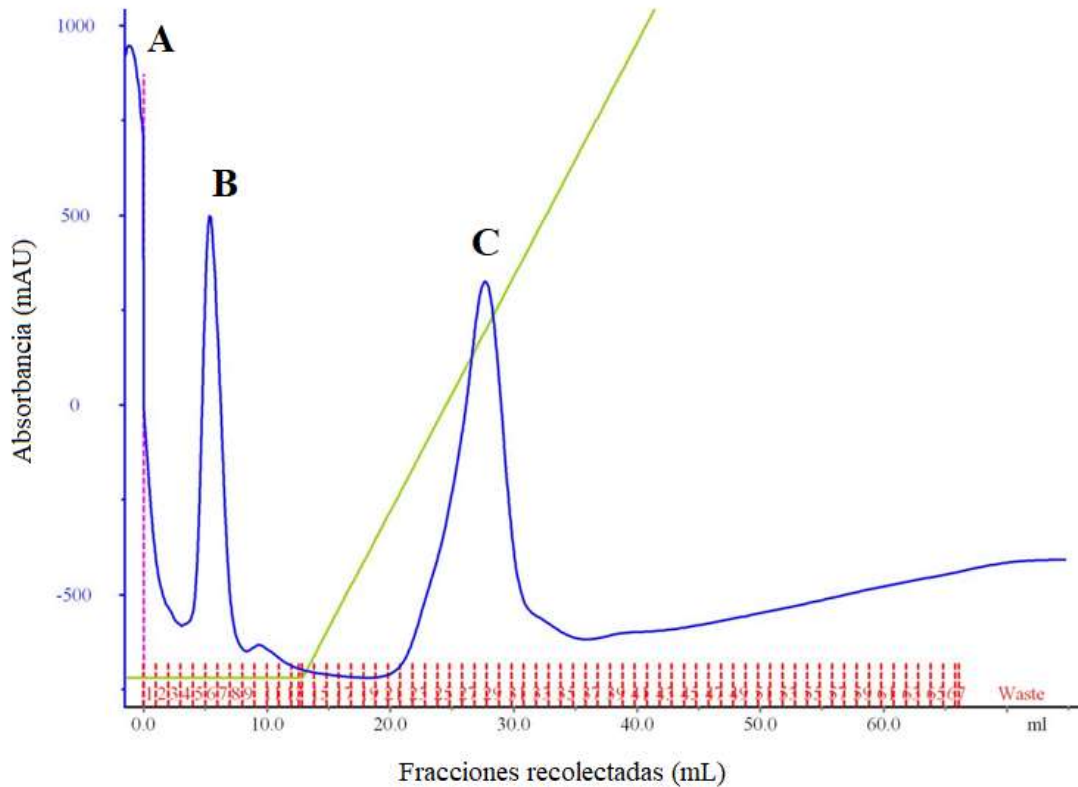
Una vez producidas las mutantes, se llevó a cabo su purificación bajo las mismas condiciones que rINU-ISO3. En la **Figura 39** y **Figura 40**, se observaron 3 señales a las que se les midió actividad con sacarosa 120 mM en buffer de acetatos 50 mM pH 4.5 por 10 min a 60°C. las fracciones correspondientes al pico C fueron las únicas que presentaron actividad catalítica.

### Cromatograma de la purificación de W79A



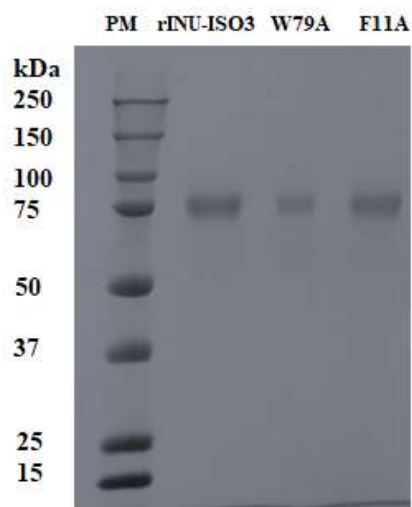
**Figura 39.** *Cromatograma obtenido de la purificación del sobrenadante de la enzima W79A, en color verde se muestra el gradiente de imidazol que se usó durante la purificación, C es la proteína de interés.*

## Cromatograma de la purificación de F113A



**Figura 40.** *Cromatograma obtenido del paso de la purificación del sobrenadante de la enzima F113A, en color verde se muestra el gradiente de Imidazol que se usó durante la purificación, C es la proteína de interés*

Posteriormente se realizó la electroforesis SDS-PAGE de las fracciones recolectadas de la columna de afinidad para verificar la pureza de las enzimas. Como se observa en la **Figura 41** en los carriles W79A y F113A se obtiene una sola banda a la misma distancia que rINU-ISO3 con un peso de ~85.2 kDa.



**Figura 41.** Verificación de la purificación de enzimas. En el carril PM se encuentra el marcador de peso molecular, carriles rINU-ISO3, W79A y F113A: Enzimas recombinantes dializadas y concentradas.

Los pasos de purificación de la W79A y la F113A se muestran en la **Tabla 17**, para W79A se obtuvo una cantidad de proteína total de 0.018 mg con una actividad específica de 13 U/mg. Para F113A se obtuvo 0.025 mg de proteína total con 125 U/mg de actividad específica, al final de la purificación. Con respecto a rINU-ISO3 la actividad enzimática disminuyó 93% y 32% para W79A y F113A respectivamente.

**Tabla 17.** Tabla de purificación de rINU-ISO3, W79A y F113A

Paso	Volumen (mL)	Proteína total (mg)			Actividad enzimática (U)			Actividad específica (U/mg proteína)			Veces de purificación			Rendimiento		
		rINU-ISO3	W79A	F113A	rINU-ISO3	W79A	F113A	rINU-ISO3	W79A	F113A	rINU-ISO3	W79A	F113A	rINU-ISO3	W79A	F113A
Extracto crudo	50	0.413	0.357	0.467	3.3	0.14	2.21	8	1	5	1	1	1	100	100	100
Columna de afinidad	12	0.77	0.058	0.097	3.6	0.20	2.37	47	3	24	6	9	5	91	69	93
Diálisis y concentración	4	0.022	0.018	0.025	4.1	0.23	3.13	185	13	125	23	33	26	81	61	70

La reacción de hidrólisis se llevó a cabo con sacarosa 120 mM en buffer de acetatos 50 mM pH 4.5 a 60°C por 15 min a 450rpm

## V.6 Evaluación de las enzimas mutantes W79A y F113A.

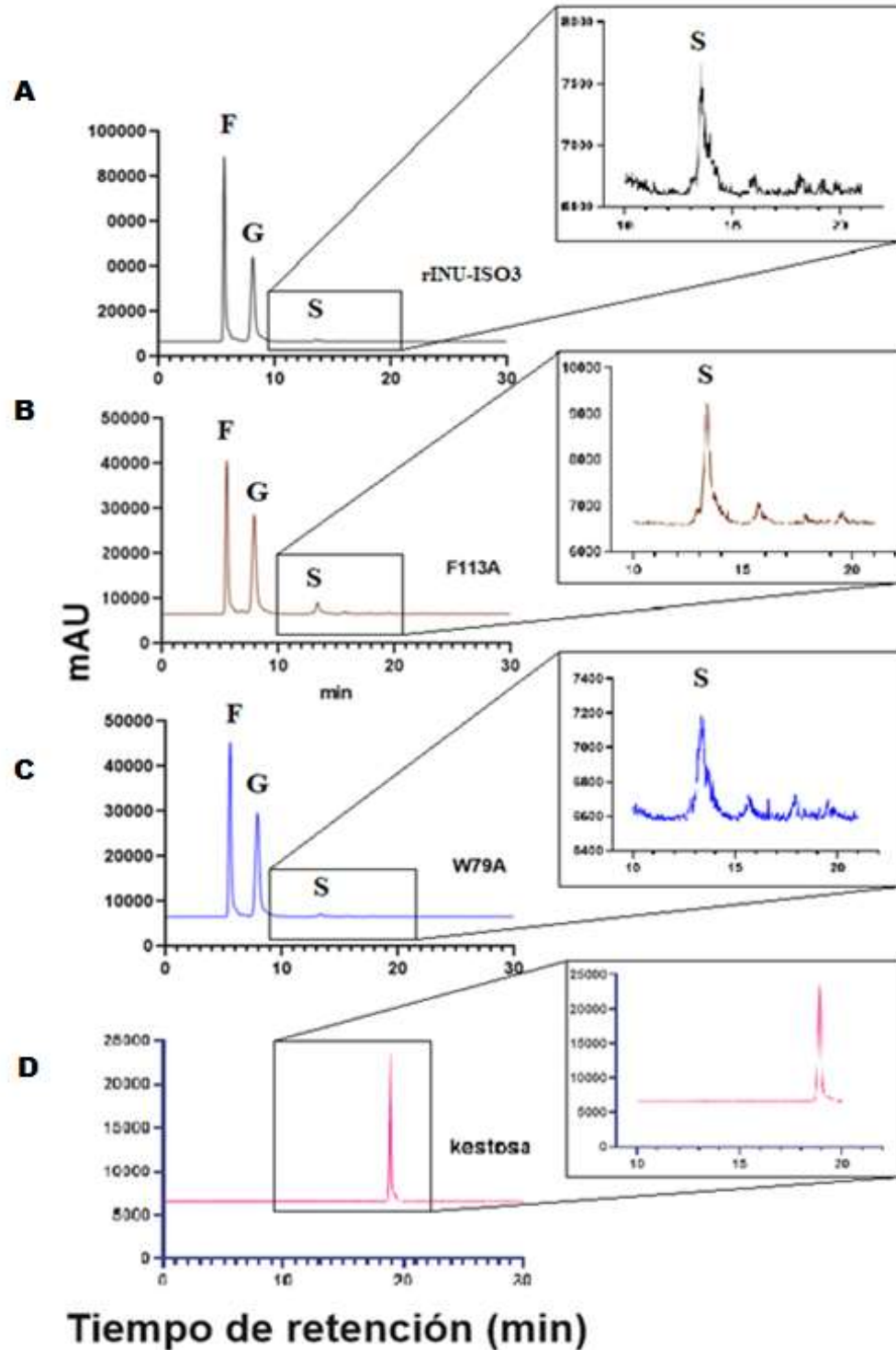
Para determinar el efecto de estas mutantes en la transfructosilación, se hicieron reacciones con las condiciones a las que se observó un mayor porcentaje de transfructosilación para rINU-ISO3, que fueron 25°C con sacarosa 1500 mM en buffer de acetatos 50 mM pH 5.5, una actividad volumétrica de 34 U/mL equivalentes a 55 µL de la enzima purificada por 20 min a 450 rpm. Los productos de estas reacciones se analizaron por TLC y HPLC.



**Figura 42.** *TLC productos de reacción de transfructosilación para las enzimas mutantes F113A y W79A, como control se puso sacarosa, fructosa y FOS en una concentración de 1% m/v y la reacción de transfructosilación de rINU-ISO3.*

Los resultados de los productos de reacción de W79A y F113A (**Figura 42**) son muy similares a rINU-ISO3 con un producto por debajo de la fructosa, además para F113A se observa ligeramente un segundo producto más abajo, que podrían ser FOS de mayor tamaño a los que produce rINU-ISO3.

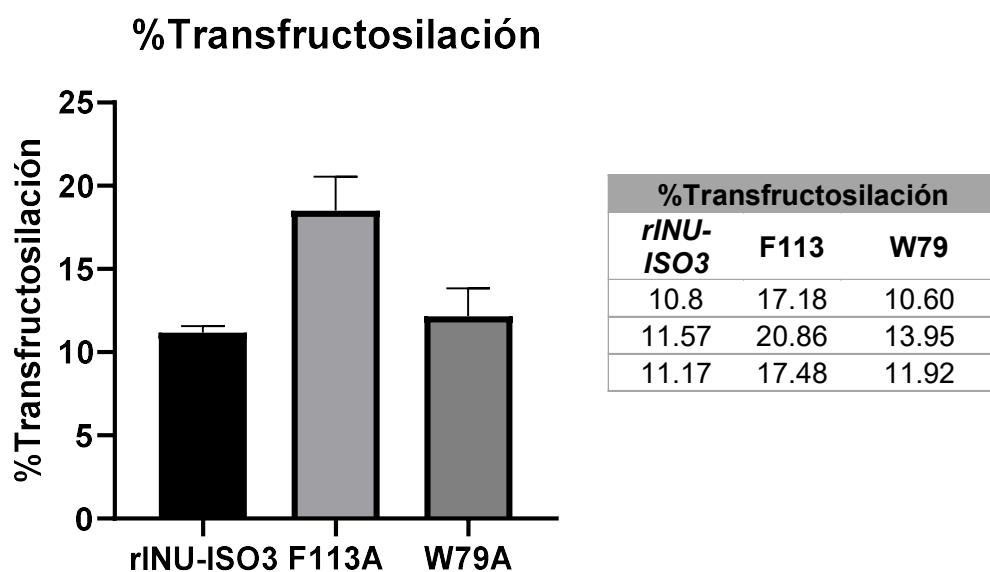
Finalmente, las reacciones se analizaron mediante HPLC usando un detector por dispersión de luz evaporativa (ELSD), siguiendo la misma metodología ya descrita para WT y se obtuvieron los cromatogramas de la **Figura 43**



**Figura 43.** Cromatogramas de los productos de reacción de transfructosilación. A: Reacción con RINU-ISO3, B; Reacción con F113A, C; Reacción con W79A, D; 1-kestosa, F: Fructosa, G: Glucosa, S: Sacarosa, kestosa: 1-kestosa.

En los cromatogramas de la **Figura 43** se observan los productos de reacción para rINU-ISO3, F113A y W79A respectivamente, con las señales correspondientes a la F: fructosa con un tiempo de retención promedio de 5.5 min, G: glucosa con un tiempo de retención promedio de 7.9 min, S: sacarosa con un tiempo de retención promedio de 13.4 min. También se observan 3 señales más pequeñas a tiempos de retención más largos en todas las reacciones y al comparar con el cromatograma de kestosa se observa que la señal de kestosa es similar a la tercera señal presente en todas las reacciones con un tiempo de retención de 18.9 min, por lo tanto, las dos señales que aparecen con un tiempo de retención de 15.7 y 17.9 pueden ser FOS de grado de polimerización 3 (DP3), pues eluyen después de la sacarosa y están antes de 1-kestosa (Linde *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2019).

Por último, se compararon los porcentajes de transfructosilación estimada de las tres enzimas, obtenidos con base a los cálculos de la cantidad de fructosa y glucosa en las reacciones enzimáticas (**Figura 44**).



**Figura 44.** Efecto de las mutaciones F113A y W79A en la reacción de transfructosilación de rINU-ISO3. Las reacciones se hicieron por triplicado bajo las mismas condiciones: 25°C, buffer de acetatos 50 mM a pH 5.5, sacarosa 1500 mM por 20 min a 450 rpm.

Con el objetivo de determinar si existe una diferencia significativa entre las mutantes y rINU-ISO3, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para un valor de  $p < 0.05$  (**Tabla A 1**). Para este análisis se tomó en cuenta el porcentaje de transfructosilación.

Como se encontró una diferencia estadística se aplicó la prueba de Tukey con  $\alpha = 0.05$  para hacer comparaciones entre rINU-ISO3 y las mutantes y se comprobó que F113A varía significativamente (**Tabla A 2**).

## V. Conclusiones.

Las mutaciones en los aminoácidos aromáticos y polares en la cavidad catalítica de la inulinasa rINU-ISO3 juegan un papel importante en la actividad de transfructosilación. Los resultados experimentales mostraron que, la enzima rINU-ISO3 es capaz de llevar a cabo la transfructosilación a T 25°C, pH 5.5 con 1500 mM de sacarosa y una concentración de enzima de 34 U/mL.

Por otro lado, los resultados experimentales mostraron que los aminoácidos aromáticos W79 y F113 juegan un papel importante en la unión de la sacarosa, hay que recordar que estos aminoácidos se encuentran en la zona aromática que tanto Altenbach y colaboradores como Van den Ende y colaboradores demostraron que pertenecen al bolsillo hidrofóbico.

La mutante W79A no mostró una diferencia significativa en la reacción de transfructosilación, sin embargo, la cantidad de enzima que se uso fue 5 veces más para lograr una actividad enzimática de 34 U/mL. Esta mutante afecta de forma negativa la actividad de la enzima, posiblemente este triptófano permite estabilizar a los sustratos mediante interacciones tipo stacking y al modificarse por alanina se pierde la actividad catalítica tal como se demostró en la dinámica molecular, donde la sacarosa sale de la cavidad, pues parece que el triptófano funciona como una especie de tapa que permite que el sustrato se conserve en el sitio catalítico.

En cuanto a la mutante F113A, con respecto a la dinámica molecular se pensó que la actividad catalítica sería menor pues la energía de unión de los aminoácidos que



interaccionan con la sacarosa fue 15% menor que rINU-ISO3, sin embargo, al aumentar la energía de unión con D53 y R181 se favorece la producción de fructooligosacáridos pues el porcentaje de transfructosilación aumenta a un 18% mientras que rINU-ISO3 y W79A se mantienen en 11 y 12% respectivamente. Como se mencionó en los resultados de dinámica molecular, F113 es uno de los aminoácidos conservados en la familia GH32 por lo que puede jugar un papel importante en el reconocimiento de fructanos y al sustituirlo por alanina permite una mayor afinidad por la sacarosa lo que le confiere una actividad tipo invertasa y por ello se favoreció la actividad transfructosilante.

## VI. Perspectivas

Determinar las condiciones de reacción de transfructosilación para las enzimas mutantes W79A y F113A, así como identificar y determinar el porcentaje de cada tipo de los FOS obtenidos.

Obtener las construcciones de las mutantes faltantes (W50A, W50F, Q236T) que se propusieron en un principio y caracterizarlas.

## VII. Referencias

- Aguado, A. L. (2011). Análisis molecular, modificación funcional y producción de enzimas susceptibles de ser utilizadas en la síntesis de fructooligosacáridos [Universidad de Valencia]. <https://digital.csic.es/bitstream/10261/38036/1/TESIS%20LAFRAYAAGUADO.pdf>
- Alberto, F., Bignon, C., Sulzenbacher, G., Henrissat, B., & Czjzek, M. (2004). The three-dimensional structure of invertase (beta-fructosidase) from *Thermotoga maritima* reveals a bimodular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting glycosidases. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(18), 18903-18910. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313911200>
- Altenbach, D., Rudiño-Pinera, E., Olvera, C., Boller, T., Wiemken, A., & Ritsema, T. (2009). An acceptor-substrate binding site determining glycosyl transfer emerges from mutant analysis of a plant vacuolar invertase and a fructosyltransferase. *Plant Molecular Biology*, 69(1-2), 47-56. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9404-7>
- Altenbach, D., Rudiño-Pinera, E., Olvera, C., Boller, T., Wiemken, A., & Ritsema, T. (2008). An acceptor-substrate binding site determining glycosyl transfer emerges from mutant analysis of a plant vacuolar invertase and a fructosyltransferase. 69, 47-56.
- Álvaro-Benito, M., Sainz-Polo, M. A., González-Pérez, D., González, B., Plou, F. J., Fernández-Lobato, M., & Sanz-Aparicio, J. (2012). Structural and Kinetic Insights Reveal That the Amino Acid Pair Gln-228/Asn-254 Modulates the

- Transfructosylating Specificity of *Schwanniomyces occidentalis*  $\beta$ -Fructofuranosidase, an Enzyme That Produces Prebiotics\*. Journal of Biological Chemistry, 287(23), 19674-19686. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.355503>
- Arrizon, J., Morel, S., Gschaedler, A., & Monsan, P. (2011). Purification and substrate specificities of a fructanase from *Kluyveromyces marxianus* isolated from the fermentation process of Mezcal. Bioresource Technology, 102(3), 3298-3303. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.071>
- Ávila, A., Galicia, N., Rodríguez, M., & López, A. (2011). Production of functional oligosaccharides through limited acid hydrolysis of agave fructans. Food Chemistry, 2(129), 380-386. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.088>
- Cazetta, M. L., Martins, P. M. M., Monti, R., & Contiero, J. (2005). Yacon (*Polymnia sanchifolia*) extract as a substrate to produce inulinase by *Kluyveromyces marxianus* var. *Bulgaricus*. Journal of Food Engineering, 66(3), 301-305. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.03.022>
- Choukade, R., & Kango, N. (2022). Purification of *Aspergillus tamaris* mycelial fructosyltransferase (m-FTase), optimized FOS production, and evaluation of its anticancer potential. Journal of Food Science, 87(7), 3294-3306. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16173>
- Claessens, G., Van Laere, A., & De proft Maurice. (1990). Purification and Properties of an Inulinase from Chicory Roots (*Cichorium intybus* L.) | Elsevier Enhanced Reader. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81611-1](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81611-1)
- Corzo, N. (2015). Prebiotics: Concept, properties and beneficial effects. NUTRICION HOSPITALARIA, 1, 98-118. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.sup1.8715>

- Farag, M. R., Alagawany, M., Bin-Jumah, M., Othman, S. I., Khafaga, A. F., Shaheen, H. M., Samak, D., Shehata, A. M., Allam, A. A., & Abd El-Hack, M. E. (2020). The Toxicological Aspects of the Heat-Borne Toxicant 5-Hydroxymethylfurfural in Animals: A Review. *Molecules*, 25(8), 1941. <https://doi.org/10.3390/molecules25081941>
- Fontana, J. G., A., & Tiboni, M. P., M. (2011, junio 11). Fructo-Oligosaccharide Production from Inulin Through Partial Citric or Phosphoric Acid Hydrolyses. [https://www.researchgate.net/publication/51209914\\_Fructo-Oligosaccharide\\_Production\\_from\\_Inulin\\_Through\\_Partial\\_Citric\\_or\\_Phosphoric\\_Acid\\_Hydrolyses](https://www.researchgate.net/publication/51209914_Fructo-Oligosaccharide_Production_from_Inulin_Through_Partial_Citric_or_Phosphoric_Acid_Hydrolyses)
- Genheden, S., & Ryde, U. (2015). The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert opinion on drug discovery*, 10, 1-13. <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1032936>
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125(6), 1401-1412. <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>
- Gibson, G., Scott, K., Rastall, R., Tuohy, K., Hotchkiss, A., Dubert-Ferrandon, A., Gareau, M., Murphy, E., Saulnier, D., Loh, G., Macfarlane, S., Delzenne, N., Ringel, Y., Koziowski, G., Dickmann, R., Lenoir-Wijnkoop, I., Walker, C., & Buddington, R. (2010). Dietary prebiotics: Current status and new definition. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, 7, 1-19. <https://doi.org/10.1616/1476-2137.15880>
- Golunski, S., Astolfi, V., Carniel, N., de Oliveira, D., Di Luccio, M., Mazutti, M. A., & Treichel, H. (2011). Ethanol precipitation and ultrafiltration of inulinases from

- Kluyveromyces marxianus*. Separation and Purification Technology, 78(3), 261-265. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.02.019>
- Gong, F., Sheng, J., Chi, Z., & Li, J. (2007). Inulinase production by a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the crude inulinase. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 34(3), 179-185. <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0184-2>
- González Díaz, R. L., Rodríguez Gómez, F. del C., & Cortés Romero, C. (2020). Exohidrolasas fructosílicas y su importancia en el metabolismo de fructanos en Agave tequilana Weber var. Azul. Revista Colombiana de Química, 49(3), 3-12. <https://doi.org/10.15446/rcq.v49n3.84882>
- Goosen, C., Yuan, X.-L., Van Munster, J. M., Ram, A. F. J., Van Der Maarel, M. J. E. C., & Dijkhuizen, L. (2007). Molecular and Biochemical Characterization of a Novel Intracellular Invertase from *Aspergillus niger* with Transfructosylating Activity. Eukaryotic Cell, 6(4), 674-681. <https://doi.org/10.1128/EC.00361-06>
- Guevara Domínguez Paulina. (2017). “BIOSÍNTESIS IN VITRO DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS EN EL SISTEMA Agave tequilana – Fragaria x ananassa” [Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politecnico Nacional]. <https://repositorio.cinvestav.mx/bitstream/handle/cinvestav/1618/SSIT0015004.pdf?sequence=1>
- Guillén, A. (2015). Extracción y purificación de enzimas degradadoras de inulina. (Inulinasas) [Universidad Nacional Autónoma de México]. <http://132.248.9.195/ptd2015/abril/0728837/Index.html>

- Jain, S. C., Jain, P. C., & Kango, N. (2012). Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using Dahlia tuber extract. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, 62-69. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000100007>
- Jitonnom, J., Ketudat-Cairns, J. R., & Hannongbua, S. (2018). QM/MM modeling of the hydrolysis and transfructosylation reactions of fructosyltransferase from *Aspergillus japonicus*, an enzyme that produces prebiotic fructooligosaccharide. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 79, 175-184. <https://doi.org/10.1016/j.jmglm.2017.11.010>
- Kango, N. (2008). Production of inulinase using tap roots of dandelion (*Taraxacum officinale*) by *Aspergillus niger*. *Journal of Food Engineering*, 85(3), 473-478. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.08.006>
- Karboune, S., Appanah, N., Khodaei, N., & Tian, F. (2018). Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides from sucrose by endo-inulinase-catalyzed transfructosylation reaction in biphasic systems. *Process Biochemistry*, 69, 82-91. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.03.010>
- Lasseur, B., Schroeven, L., Lammens, W., Le Roy, K., Spangenberg, G., Manduzio, H., Vergauwen, R., Lothier, J., Prud'homme, M.-P., & Van den Ende, W. (2009). Transforming a Fructan:Fructan 6G-Fructosyltransferase from Perennial Ryegrass into a Sucrose:Sucrose 1-Fructosyltransferase. *Plant Physiology*, 149(1), 327-339. <https://doi.org/10.1104/pp.108.125559>
- Linde, L., Macías, I., Fernandez-Arrojo, L., Plou, F., Jiménez, A., & Lobato, M. (2008). Molecular and Biochemical Characterization of a -Fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied and environmental microbiology*, 75, 1065-1073. <https://doi.org/10.1128/AEM.02061-08>

- Lira León, G., Montiel Pacheco, C., Universidad, N. A. de M., Universidad, N. A. de M., & Universidad, N. A. de M. (2021). Producción de fructooligosacáridos (FOS) catalizada por la exoinulinasa de *Kluyveromyces marxianus* AZ8.
- Lobato, M., Macías, I., Alberdi, D., Linde, L., Fernandez-Arrojo, L., & Plou, F. (2007). Nueva enzima, con actividad fructofuranosidasa para la obtención de oligosacáridos prebióticos.
- Loo, J., Cummings, J., Delzenne, N., Englyst, H., Franck, A., Hopkins, M., Kok, N., Macfarlane, G., Newton, D., Quigley, M., Roberfroid, M., Vliet, T., & Heuvel, E. G. H. M. (1999). Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: A consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). *The British journal of nutrition*, 81, 121-132. <https://doi.org/10.1017/S0007114599000252>
- Martins, G. N., Ureta, M. M., Tymczynszyn, E. E., Castilho, P. C., & Gomez-Zavaglia, A. (2019). Technological Aspects of the Production of Fructo and Galacto-Oligosaccharides. Enzymatic Synthesis and Hydrolysis. *Frontiers in Nutrition*, 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2019.00078>
- Monzon, A. M., Zea, D. J., Fornasari, M. S., Saldaño, T. E., Fernandez-Alberti, S., Tosatto, S. C. E., & Parisi, G. (2017). Conformational diversity analysis reveals three functional mechanisms in proteins. *PLOS Computational Biology*, 13(2), e1005398. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005398>
- Moshfegh, A., Friday, J., Goldman, J., & Ahuja, J. K. C. (1999). Presence of Inulin and Oligofructose in the Diets of Americans. *The Journal of nutrition*, 129, 1407S-11S. <https://doi.org/10.1093/jn/129.7.1407S>

- Nakamura, T., Shitara, A., Matsuda, S., Matsuo, T., Suiko, M., & Ohta, K. (1997). Production, purification and properties of an endoinulinase of *Penicillium sp.* TN-88 that liberates inulotriose. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(4), 313-318. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)89250-1](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)89250-1)
- Navarro, A. R., Rubio, M. C., & Latina, C. F. (2012). Producción de fructooligosacáridos por invertasa de *Aspergillus niger* IB56: Un prebiótico de importancia para la salud humana y animal. <https://doi.org/10.22370/bolmicol.2012.27.1.891>
- Pérez, E. R., Martínez, D., Menéndez, C., Alfonso, D., Rodríguez, I., Trujillo, L. E., Sobrino, A., Ramírez, R., Pimentel, E., & Hernández, L. (2021). Fructooligosaccharides production by immobilized *Pichia pastoris* cells expressing *Schedonorus arundinaceus* sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 48(5-6), kuab036. <https://doi.org/10.1093/jimb/kuab036>
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 100178. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.015853>
- Ramos, R. A. A., García, D. M., & Cruz, E. R. P. (2019). Fructanos tipo inulina: Efecto en la microbiota intestinal, la obesidad y la saciedad. *Gaceta Médica Espirituana*, 21(2), Article 2. <https://revgmespirituana.sld.cu/index.php/gme/article/view/1911>
- Rentschler, E., Schuh, K., Krewinkel, M., Baur, C., Claaßen, W., Meyer, S., Kuschel, B., Stressler, T., & Fischer, L. (2015). Enzymatic production of lactulose and



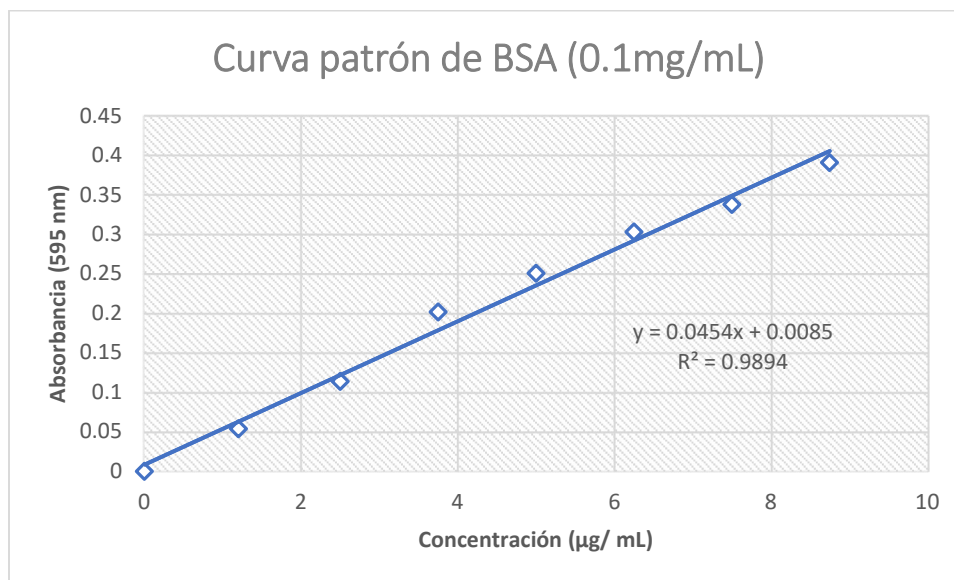
- epilactose in milk. *Journal of Dairy Science*, 98(10), 6767-6775.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2015-9900>
- Risso, F. V. A., Mazutti, M. A., Treichel, H., Costa, F., Maugeri, F., & Rodrigues, M. I. (2012a). Assessment of fructooligosaccharides production from sucrose in aqueous and aqueous-organic systems using immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. *Food Science and Technology*, 32(2), 245-249. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612012005000030>
- Risso, F. V. A., Mazutti, M. A., Treichel, H., Costa, F., Maugeri, F., & Rodrigues, M. I. (2012b). Comparison Between Systems for Synthesis of Fructooligosaccharides from Sucrose Using Free Inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. *Food and Bioprocess Technology*, 5(1), 331-337. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0272-1>
- Ritsema, T., Hernández, L., Verhaar, A., Altenbach, D., Boller, T., Wiemken, A., & Smeeckens, S. (2006). Developing fructan-synthesizing capability in a plant invertase via mutations in the sucrose-binding box. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 48(2), 228-237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02862.x>
- Ritsema, T., V., A., & Vijn I, S. S. (2004). Fructosyltransferase mutants specify a function for the  $\beta$ -fructosidase motif of the sucrose-binding box in specifying the fructan type synthesized | SpringerLink. *Plant Molecular Biology*, 54, 853-863. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-0276-1>
- Robert, J. (2013). Identificación y caracterización de cepas que emplean inulina ramificada única fuente de carbono. [Universidad Nacional Autónoma de México]. <http://132.248.9.195/ptd2013/octubre/0703841/Index.html>

- Sandoval, M., & Milagros, R. (2017). Hidrólisis química y enzimática de un extracto de yacón (*Smallanthus sonchifolius*) para la obtención de fructosa. Universidad Nacional Agraria La Molina. <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/2663>
- Santos, A., & Maugeri, F. (2007). Synthesis of Fructooligosaccharides from Sucrose Using Inulinase from *Kluyveromyces marxianus*. *Food Technology and Biotechnology*, 45(2), 181-186.
- Sheng, J., Chi, Z., Li, J., Gao, L., & Gong, F. (2007). Inulinase production by the marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the crude inulinase. *Process Biochemistry*, 42(5), 805-811. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.01.016>
- Singh, R. S., Singh, T., Hassan, M., & Kennedy, J. F. (2020). Updates on inulinases: Structural aspects and biotechnological applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 193-210. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.078>
- Sonia A. Camilo E. & López-Munguía A-. (1998). PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS CRUDOS CON ACTIVIDAD DE FRUCTOSILTRANSFERASA. 27, 53-56.
- Suenaga, A., Okimoto, N., Hirano, Y., & Fukui, K. (2012). An Efficient Computational Method for Calculating Ligand Binding Affinities. *PLoS ONE*, 7(8), e42846. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042846>
- Tian, F., Inthanavong, L., & Karboune, S. (2011). Purification and Characterization of Levansucrases from *Bacillus amyloliquefaciens* in Intra- and Extracellular Forms Useful for the Synthesis of Levan and Fructooligosaccharides.

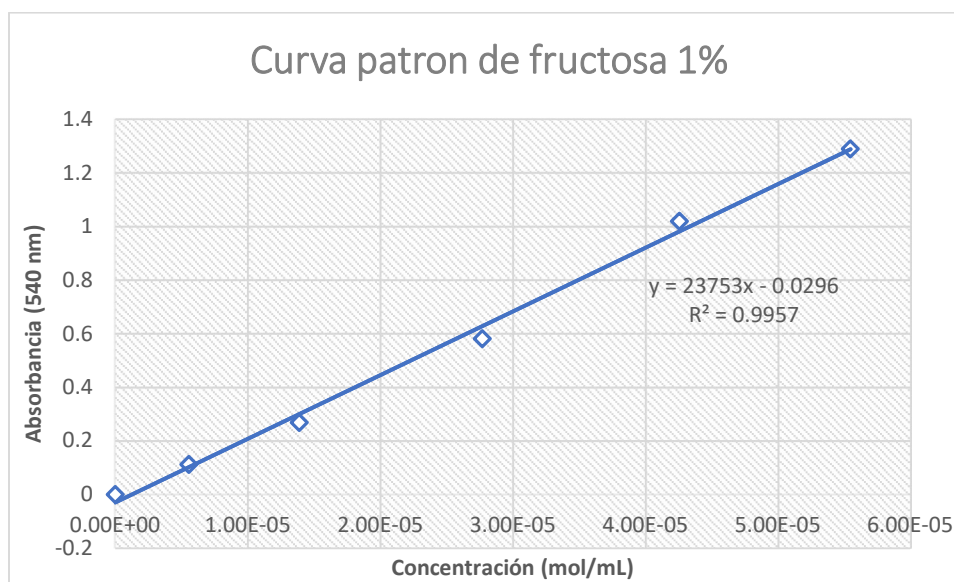
- Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 75(10), 1929-1938.  
<https://doi.org/10.1271/bbb.110315>
- Trapala, J. (2017). Obtención y caracterización de inulinasas a partir de *Kluyveromyces sp.* En la hidrólisis de agavina. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Trapala, J., Bustos-Jaimes, 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.  
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105718>
- Van den Ende, W., Lammens, W., Van Laere, A., Schroeven, L., & Le Roy, K. (2009). Donor and acceptor substrate selectivity among plant glycoside hydrolase family 32 enzymes: Donor and acceptor substrate selectivity in GH32. FEBS Journal, 276(20), 5788-5798. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07316.x>
- Xia, Y., & Xun, L. (2017). Revised Mechanism and Improved Efficiency of the QuikChange Site-Directed Mutagenesis Method. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 1498, 367-374. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6472-7\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6472-7_25)
- Yuan, S., Roy, K. L., Venken, T., Lammens, W., Ende, W. V. den, & Maeyer, M. D. (2012). pKa Modulation of the Acid/Base Catalyst within GH32 and GH68: A Role in Substrate/Inhibitor Specificity? PLOS ONE, 7(5), e37453.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037453>

Yun, J. W. (1996). Fructooligosaccharides—Occurrence, preparation, and application. *Enzyme and Microbial Technology*, 19(2), 107-117.  
[https://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00188-3](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00188-3)

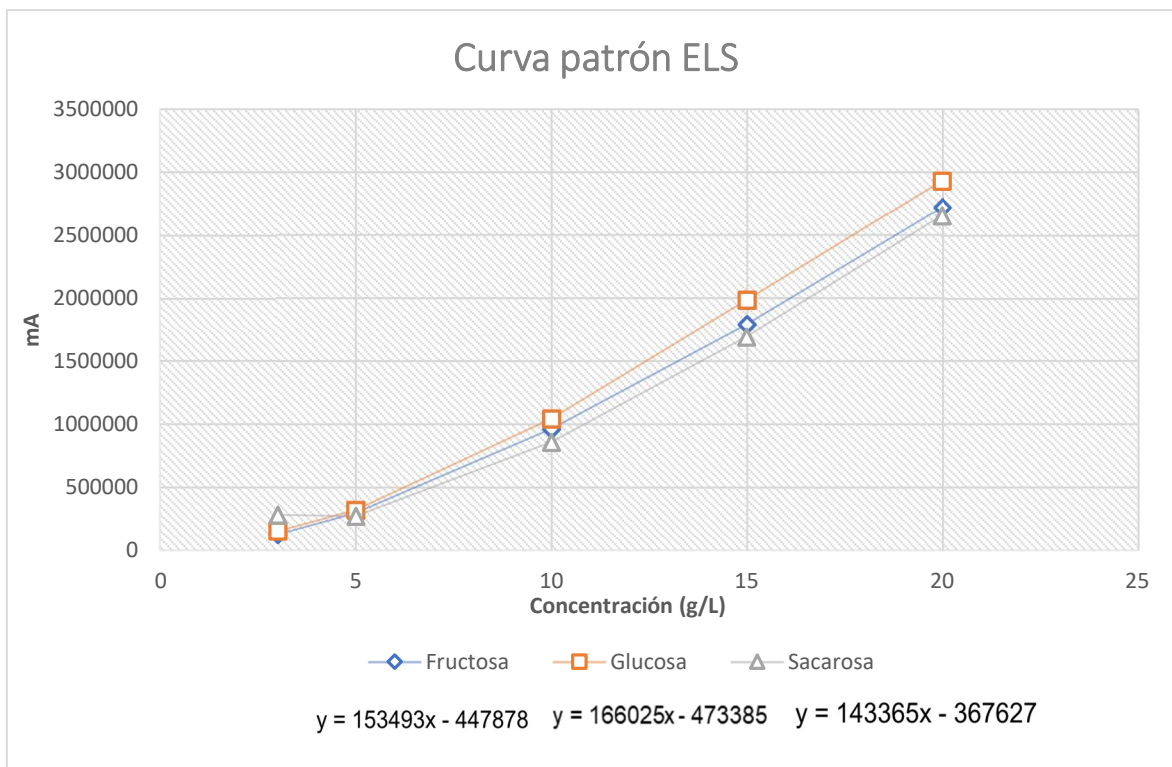
## VIII. ANEXO A



**Figura A.1.** Curva patrón de BSA para determinar proteína por el método de Bradford.



**Figura A.2.** Curva de calibración de fructosa a partir de una disolución de fructosa 1 g/ 100 mL para la determinación de azúcares reductores por el método DNS (Miller, 1959).



**Figura A. 3** Curvas patrón de glucosa, fructosa y sacarosa de 3 a 20 g/L para cuantificación de glucosa y fructosa libres por HPLC.

Análisis estadístico de porcentaje de transfructosilación de rINU-ISO3 con respecto a W79A y F113A

**Tabla A 1.** Resumen análisis estadístico ANOVA para el porcentaje de transfructosilación para rINU-ISO3 y sus mutantes

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
rINU-ISO3	3	33.54	11.18	0.15
W79A	3	36.47	12.16	2.85
F113A	3	55.52	18.51	4.18

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F

Entre grupos	94.95642222	2	47.47821111	19.85963600	0.00226025	5.14325285
Dentro de los grupos	14.34413333	6	2.39068889			
Total	109.30055556	8				

Donde:

Ho: %T= en rINU-ISO3, F113A y W79A

Ha: Al menos una de las enzimas tiene un %T diferente

Valor prueba F	Valor P	SI/NO
<b>19.86 &gt; valor crítico para F</b>	0.0022 < 0.05	Si hay diferencia significativa con 95% de confiabilidad Se rechaza la hipótesis nula

Prueba de Tukey con  $\alpha = 0.05$  para hacer comparaciones entre rINU-ISO3 y las mutantes.

**Tabla A 2.** Prueba de Tukey para determinar diferencia significativa entre grupos

PRUEBA DE TUKEY		
Diferencia honestamente significativa	HSD(w)=	3.874276691
Q alfa (de tablas)	Multiplicador =	4.34
Cuadrado del error medio	CME=	2.390688889
Tamaño de muestra de cada grupo	n=	3

$$w = q \times \sqrt{\frac{CME}{r}}$$

	Control	W79A	F113A
rINU-ISO3		0.977	7.327
W79A			6.350
F113A			