



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA/ FUNCIÓN DE LA REGIÓN N₁₀₀ TERMINAL DE LA INULOSACARASA (IsIA) de *Leuconostoc citreum* CW28

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
Q.F.B INGRID MERCADO DEL RÍO

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Clarita Olvera Carranza
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Claudia Rodríguez Almazán
[Instituto de biotecnología, UNAM](#)

Dra. Romina Rodríguez Sanoja
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

Cuernavaca, Mor., Septiembre, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Polímeros Biocompatibles y Nanotecnología adscrito al Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Clarita Olvera Carranza.

El proyecto fue financiado por la Universidad Nacional Autónoma de México por el programa DGAPA-PAPIIT a través del proyecto IN216120, además del apoyo económico otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca no. 855138.

*"C'est le temps que tu as perdu pour
ta rose qui fait ta rose si importante."
Le petite Prince*

A mi familia.

A mi hermano, porque el trabajo duro
siempre es recompensado.

A mis amigos

A los estudiantes que sufren por una
tesis, porque esta sí me hizo sufrir y no
veía la hora de acabarla.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, de quienes sólo he recibido apoyo incondicional. Porque gracias a ellos soy y estoy. Porque ellos ayudaron a que esto fuera posible.

A Walter, por todo el amor, paciencia (mucho paciencia), ayuda (mucho también) y enseñanzas brindadas. Por el nuevo camino que recorreremos juntos. Por devolverme la esperanza.

A la Dra. Clarita Olvera, por su admirable e incanzable dedicación, por esas discusiones hasta tarde, por los buenos y malos ratos. Por su enorme paciencia. Por creer en mí. Gracias infinitas.

Al grupo de la Dra Marcela Ayala, por sus excelentes observaciones y comentarios. Gracias a Rose, por la ayuda brindada en la parte técnica y a doña Leo, por que sin ella, esto se habría vuelto eterno.

A mis compañeros del LINPI3, por las buenas carcajadas y excelentes memes y por hacer más llevaderas las cinéticas y análisis fallidos, por las enseñanzas y observaciones tan atinadas. Gracias Flor, Chava, Kike, Ray, Jorge, Karla, Mau, Gerard. Gracias también a los que estuvieron... y ya no están.

Gracias a mis amigas entrañables Monse y Benita, que nunca dejarán de ser una parte importantísima en mi vida. Gracias a mis compañeritas de telas, en especial a Luna y Helio que, sin saberlo, mejoraron mucho mi vida.

Gracias a la familia que nunca dejó de preguntar, aunque no siempre entendía de lo que les hablaba. Gracias. Los amo.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ÍNDICE DE TABLAS.....	9
TABLA DE ABREVIATURAS.....	10
DEFINICIÓN DE CONCEPTOS.....	11
RESUMEN.....	12
1. ANTECEDENTES.....	14
1.1 FRUCTANAS.....	14
1.2 FRUCTANSACARASAS.....	15
1.3 MECANISMO DE ELONGACIÓN DE FRUCTANAS.....	19
1.4 FRUCTANSACARASAS MULTIDOMINIO.....	20
1.5 ASPECTOS GENERALES DE LA INULOSACARASAS.....	22
1.6 INULOSACARASA DE <i>LEUCONOSTOC CITREUM</i> CW28 (ISLA).....	28
1.7 ESTUDIO DE RELACIÓN ESTRUCTURA / FUNCIÓN DE LOS DOMINIOS ADICIONALES DE LA INULOSACARASA (ISLA) DE <i>LEUCONOSTOC CITREUM</i> CW28.....	30
1.8 FUNCIÓN DE LOS DOMINIOS N-TERMINAL Y C-TERMINAL EN LAS GLUCANSACARASAS.....	33
1.9 EFECTO DE LOS DOMINIOS ADICIONALES EN LA PROCESIVIDAD DE FRUCTANSACARASAS.....	35
1.10 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	37
2. JUSTIFICACIÓN.....	38
3. HIPÓTESIS.....	38
4. OBJETIVO.....	39
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	39
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	39
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	40
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
6.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	41
6.1.1 <i>Cepas utilizadas</i>	41
6.1.2 <i>Medios y condiciones de cultivo</i>	41
6.1.3 <i>Preparación de células electrocompetentes</i>	42
6.1.4 <i>Sobreexpresión y obtención de las versiones truncadas de ISLA en E. coli</i>	42
6.2 TÉCNICAS ENZIMÁTICAS Y BIOQUÍMICAS.....	43
6.2.1 <i>Purificación de proteínas recombinantes</i>	43
6.2.1.1 Purificación de enzimas solubles.....	43
6.2.1.2 Purificación de enzimas por cuerpos de inclusión.....	45
6.2.2 <i>Replegamiento de proteínas</i>	45
6.2.3 <i>Cuantificación de proteína</i>	46
6.2.4 <i>Electroforesis de proteínas</i>	46
6.2.5 <i>Zimograma</i>	46
6.3 CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA.....	47
6.3.1 <i>Determinación de la actividad enzimática fructosiltransferasa</i>	47
6.3.2 <i>Ensayo de estabilidad enzimática</i>	47

6.3.3	<i>Ensayo de temperatura óptima de IsIA5</i>	48
6.3.4	<i>Ensayo de pH óptimo de IsIA5</i>	48
6.4	DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE PRODUCTOS	50
6.4.1	<i>Determinación del porcentaje de sacarosa</i>	50
6.4.2	<i>Determinación de azúcares simples</i>	50
6.4.3	<i>Determinación de fructooligosacáridos por cromatografía en capa fina (TLC)</i>	51
6.4.4	<i>Determinación de Fructooligosacáridos por HPAEC-PAD</i>	51
6.4.5	<i>Determinación de polímero</i>	51
7.	RESULTADOS	53
7.1	ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA REGIÓN N₁₀₀ TERMINAL EN EL MECANISMO DE ELONGACIÓN	53
7.2	CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE ISIA5	54
7.2.1	<i>Determinación de temperatura y pH óptimos</i>	54
7.3	CARACTERIZACIÓN DE LAS VERSIONES TRUNCADAS A 20°C	56
7.3.1	<i>Caracterización de la reacción llevada a cabo por IsIA4 a 20°C</i>	56
7.3.1.1	<i>Análisis de la reacción y relación hidrólisis / transferencia de IsIA4 a 20°C</i>	56
7.3.1.2	<i>Perfil de productos de IsIA4 a 20°C</i>	58
7.3.2	<i>Caracterización de la reacción llevada a cabo por IsIA5 a 20°C</i>	61
7.3.2.1	<i>Análisis de la reacción y relación hidrólisis / transferencia de IsIA5 a 20°C</i>	61
7.3.2.2	<i>Perfil de productos de IsIA5 a 20°C</i>	62
7.4	CARACTERIZACIÓN DE LAS VERSIONES TRUNCADAS EN CONDICIONES ESTÁNDAR DE REACCIÓN .66	
7.4.1	<i>Determinación de la actividad enzimática de las versiones truncadas en condiciones estándar</i> 66	
7.4.2	<i>Caracterización de la reacción llevada a cabo por IsIA4 en condiciones óptimas</i>	67
7.4.2.1	<i>Análisis de la reacción y relación hidrólisis / transferencia de IsIA4 a 30°C</i>	67
7.4.2.2	<i>Perfil de productos de IsIA4 a 30°C</i>	68
7.5	DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL AUMENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO EN EL MECANISMO DE ELONGACIÓN DE LAS VERSIONES TRUNCADAS	72
7.5.1	<i>Caracterización de la reacción y perfil de productos de IsIA4 a 1170 mM de sustrato</i>	72
7.5.1.1	<i>Análisis de la reacción y relación hidrólisis / transferencia de IsIA4 a 1170 nM de sustrato</i> ..	72
7.5.1.2	<i>Perfil de productos de IsIA4 a 1170mM de sustrato</i>	74
7.5.2	<i>Caracterización de la reacción y el perfil de productos de IsIA5 a 1170 mM de sustrato</i>	77
7.5.2.1	<i>Análisis de la reacción y relación hidrólisis / transferencia de IsIA5 a 1170 mM de sustrato</i> .	77
7.5.2.2	<i>Perfil de productos de IsIA5 a 1170mM de sustrato</i>	79
8.	DISCUSIÓN	83
8.1	LA REMOCIÓN DE LA REGIÓN N₁₀₀ TERMINAL DE LA INULOSACARASA ISIA AFECTA LA TEMPERATURA ÓPTIMA DE REACCIÓN	83
8.2	PARTICIPACIÓN DE LA REGIÓN N₁₀₀ TERMINAL EN LA REACCIÓN DE HIDRÓLISIS VS TRANSFERENCIA 88	
8.3	EFFECTOS DEL CAMBIO EN LA TEMPERATURA DE REACCIÓN EN ISIA4	93
8.4	EFFECTO DEL AUMENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y EN EL PERFIL DE PRODUCTOS	95
9.	CONCLUSIONES	99
10.	PERSPECTIVAS	100
11.	BIBLIOGRAFÍA	101
12.	ANEXOS	106
12.1	EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE ISIA4	106
12.2	EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE ISIA5	107

12.2.1	Optimización de la expresión de IsIA5	107
12.2.2	Purificación de la enzima IsIA5.....	110
12.2.2.1	Purificación de IsIA5 de cuerpos de inclusión.....	110
12.2.2.1.1	Renaturalización de enzima de la fracción insoluble	111
12.2.2.2	Purificación de enzima de la fracción soluble.....	112
12.3	TABLA DEL PORCENTAJE DE PRODUCTOS DE ALTO Y BAJO PESO MOLECULAR SINTETIZADO POR LAS VERSIONES TRUNCADAS A DIFERENTES CONDICIONES DE REACCIÓN.....	115
12.4	ESQUEMATIZACIÓN DE LOS DIFERENTES PRODUCTOS SINTETIZADOS POR ISLA4 E ISLA5 A DIFERENTES CONDICIONES DE REACCIÓN.....	116

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:1 Estructuras esquemáticas de a) levana b) inulina	14
Figura 1:2 Representación del mecanismo de catálisis de las fructosiltransferasas.....	15
Figura 1:3 Estructura del dominio catalítico de las FNSs.	16
Figura 1:4 Subsitios en el dominio catalítico de las FTF.	17
Figura 1:5. Esquema del mecanismo molecular de catálisis de SacB.	18
Figura 1:6 Equema del mecanismo de elongación de las FTFs.....	19
Figura 1:7 Comparación de la estructura primaria de FNSs multidominio contra una FTF unidominio (LS de <i>B. subtilis</i>).....	20
Figura 1:8 Esquema de algunas inulosacarasa caracterizadas entre 2007 y 2018	22
Figura 1:9. Estructura cristalográfica de la inulosacarasa de <i>Lactobacillus johnsonii</i> , InuJ.	25
Figura 1:10. Interacciones de residuos de los subsitios -1 y +1 con la sacarosa (SCR1) en el sitio activo de InuJ.....	27
Figura 1:11 Representación de la inulosacarasa de <i>Leuconostoc citreum</i> CW28 (IsIA).	28
Figura 1:12 Versiones truncadas construidas a partir de la inulosacarasa de <i>Leuconostoc citreum</i> CW28 (IsIA)	30
Figura 1:13 a) Estructura de la GTF de <i>L. reuteri</i> 121 (GTFA).	33
Figura 1:14 Representacion esquemática de las versiones truncadas de LevS.	35
Figura 6:1 Esquema del proceso de purificación de cuerpos de inclusión.....	45
Figura 7:1. Versiones truncadas seleccionadas para el estudio de la región N ₁₀₀ terminal	53
Figura 7:2 Determinación de pH y temperatura óptimos de IsIA5.	54
Figura 7:3 A) Ensayo de cromatografía en capa fina (TLC) del perfil de productos de IsIA4 1 U, 20°C y 292 mM de sacarosa.	57
Figura 7:4 Perfil de productos de IsIA4 a 1 U/mL, 20°C y 292 mM de sacarosa.....	59
Figura 7:5 Cuantificación de polímero de alto peso molecular de IsA4 a 292 mM de sustrato.	60
Figura 7:6 A) Ensayo de cromatografía en capa fina (TLC) del perfil de productos de IsIA5 con sacarosa 292 mM.	62
Figura 7:7 Perfil de productos de IsIA5 a 1 U/mL, 20°C y 292 mM.	63
Figura 7:8 Cuantificación de polímero de alto peso molecular de IsA5 a 292 mM de sustrato. * Esta señal no representa algún producto sintetizado por la enzima.	64
Figura 7:9 A) Ensayo de cromatografía en capa fina (TLC) del perfil de productos de IsIA4 a 30°C y sacarosa 292 mM.	67
Figura 7:10 Perfil de productos de IsIA4 a 1 U/mL, 30°C y 292 mM de sustrato.....	69
Figura 7:11 Cuantificación de polímero de alto peso molecular de IsIA4 a 30°C y 292 mM de sacarosa.	70
Figura 7:12 A) Ensayo de cromatografía en capa fina (TLC) del perfil de productos de IsIA4 con 1 U, 20°C y sacarosa 1170 mM.	73
Figura 7:13 Perfil de productos de IsIA4 a 1 U/mL, 20°C y 1170 mM.	75
Figura 7:14 Cuantificación de polímero de alto peso molecular de IsA4 a 1170 mM de sustrato....	76
Figura 7:15 A) Ensayo de cromatografía en capa fina (TLC) del perfil de productos de IsIA5 con 1 U, 20°C y 1170 mM de sacarosa.	78
Figura 7:16 Perfil de productos de IsIA5 a 1 U/mL, 20°C y 1170 mM de sustrato.....	80
Figura 7:17 Cuantificación de polímero de alto peso molecular de IsA5 a 1170 mM.....	81
Figura 8:1 Curva de progreso de las reacciones llevadas a cabo por IsIA4 e IsIA5 con 292 mM de sacarosa.	84
Figura 8:2 Ensayo de estabilidad al almacenamiento de IsIA5, a 35°C. El ensayo se llevó a cabo a pH 6.0 y 1170 mM de sustrato.....	86
Figura 8:3. Esquemmatización de los productos de reacción de IsIA4 e IsIA5 a 20°C y 292 mM de sacarosa	90
Figura 8:4 Esquemmatización de los productos de reacción de IsIA4 a 20°C y 30°C con 292 mM de sustrato	94

Figura 8:5 Curva de progreso de reacciones llevadas a cabo por IsIA4 e IsIA5 con 1170 mM de sacarosa.	95
Figura 8:6 Esquematación de los productos de reacción de IsIA4 e IsIA5 con 1170 mM de sustrato	98
Figura 12:1 Purificación de IsIA4.	106
Figura 12:2 Optimización de la expresión de IsIA5.	108
Figura 12:3 Zimograma de las fracciones soluble e insoluble de IsIA5.	109
Figura 12:4 Proceso de purificación de cuerpos de inclusión (C.I)	110
Figura 12:5 Zimograma de los cuerpos de inclusión (C.I) de IsIA5.	111
Figura 12:6 Gel desnaturante de proteínas (A) y zimograma (B) de IsIA5 renaturalizada.	112
Figura 12:7 Gel desnaturante de proteínas (A) y cromatograma de purificación por cromatografía de afinidad (B).	113

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1:1 Características estructurales y productos sintetizados por las inulosacarosas.	23
Tabla 1:2 Propiedades bioquímicas de las inulosacarosas	24
Tabla 1:3 Resumen de las propiedades bioquímicas de IsIA y sus versiones truncadas	32
Tabla 6:1 Cepas utilizadas y sus características	41
Tabla 6:2. Composición del medio Luria Bertani (LB)	42
Tabla 6:3. Composición del medio YENB.....	42
Tabla 6:4. Vectores e inductores para las diferentes versiones truncadas	43
Tabla 7:1 Concentración de polímero de alto peso molecular a 292 mM, producido por IsIA4 a 1 U y 20°C.....	61
Tabla 7:2 Concentración de polímero de alto peso molecular a 292 mM de sustrato, producido por IsIA5 a 1 U y 20°C	65
Tabla 7:3. Actividad específica y porcentaje de hidrólisis / transferencia de IsIA4 e IsIA5 en condiciones estándar de reacción (30°C y 292mM de sustrato).	66
Tabla 7:4. Concentración de polímero de alto peso molecular a 292 mM de sustrato producido por IsIA4 a 1 U y 30°C	71
Tabla 7:5 Concentración de polímero de alto peso molecular a 1170 mM, producido por IsIA4 a 1 U y 20°C	77
Tabla 7:6 Concentración de polímero de alto peso molecular a 1 U, 20°C y 1170 mM de sustrato.	82
Tabla 8:1 Porcentaje de polímero de alto y bajo peso molecular sintetizado por las versiones truncadas a 292 mM de sacarosa	89
Tabla 8:2 Porcentaje de polímero de alto y bajo peso molecular sintetizado por las versiones truncadas a 1170 mM de sacarosa	96
Tabla 12:1. Determinación de la actividad volumétrica de IsIA5 de la fracción soluble e insoluble. Determinación en buffer de trabajo, a 30°C y 292 mM de sustrato.....	109
Tabla 12:2. Actividad enzimática de IsIA5 pura a 30°C y 292 mM de sustrato, obtenida por diferentes métodos de purificación.....	114

TABLA DE ABREVIATURAS

ASR	Alternansacarasa
DNA	Acido desoxirribonucléico
D.O	Densidad óptica
DP	Grado de polimerización
FOS	Fructooligosacáridos
FNSs	Fructansacarasa
FNSs-MD	Fructansacarasa multidominio
GBD	Dominio de unión a glucano
GnHCl	Cloruro de guanidinio
GH	Glicósido hidrolasas, <i>familia de</i>
GNS	Glucansacarasa
GTF	Glucosiltransferasa
HPAEC-PAD	Cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección de pulso amperométrico
IPE	Enzima productora de inulina
IS	inulosacarasa
IsIA	Inulosacarasa de <i>Leuconostoc citreum</i> CW28
LB	Luria Bertani, <i>medio de cultivo</i>
LS	levansacarasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pAPM	Polímero de alto peso molecular
pBPM	Polímero de bajo peso molecular
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Región de transición
SacB	Levansacarasa de <i>Bacillus subtilis</i>
TLC	Cromatografía en capa fina

DEFINICIÓN DE CONCEPTOS

Especificidad de enlace/ regioselectividad: Se refiere a la propiedad de la enzima que sintetiza el tipo de enlace presente en un polímero de fructanas. Este puede ser β -(2,1) para el caso de un polímero de inulina, o β -(2,6) para el caso de un polímero de levana.

Especificidad de producto: Es la propiedad de la enzima que define el tipo de producto en función del peso molecular del mismo. Una fructosiltransferasa es capaz de producir polímero de alto peso molecular y/o productos de bajo peso molecular (polímero y fructooligosacáridos):

Mecanismo de elongación: Se refiere a la procesividad con que la enzima sintetiza sus productos. En un mecanismo procesivo los monómeros de fructosa son sucesivamente incorporados a una cadena de fructana hasta la liberación de ésta de la enzima. En un mecanismo no procesivo los productos son liberados después de la transferencia de cada monómero, con la consecuente acumulación de intermediarios en el medio de reacción.

Perfil de productos: Es el perfil de fructooligosacáridos (perfil de FOS) o el perfil de polímero de alto/ bajo peso molecular (perfil de polímero). Es el conjunto de productos (fructooligosacáridos con un $DP < 10$ o polímero/fructana) producidos por una fructosiltransferasa.

RESUMEN

Las fructansacarasas (FNSs) son enzimas pertenecientes a la familia GH68 de las glicósido-hidrolasas, capaces de sintetizar polímero de fructosa, con una unidad de sacarosa en el extremo no reductor. La catálisis de estas enzimas tiene lugar a través de un mecanismo procesivo, donde la enzima produce polímero, o bien, mediante un mecanismo no procesivo, donde la enzima sólo sintetiza productos de bajo peso molecular.

Dentro de esta familia de FNSs, existe una subfamilia de FNSs multidominio, las cuales presentan dominios adicionales en las regiones N- y C-terminal que flanquean al dominio catalítico. La función de dichos dominios ha sido ampliamente estudiada a través de versiones truncadas de enzimas como la levansacarasa LevS, de *L. mesenteroides*, o la inulosacarasa IsIA de *L. citreum* CW28. Recientemente, se demostró en una versión truncada de LevS, que esta enzima cuenta con una zona de procesividad en el extremo N-terminal que le permite a la misma operar a través de un mecanismo procesivo, sin embargo, se desconoce si IsIA presenta una zona de procesividad similar a aquella reportada para LevS.

Para determinar si la procesividad de IsIA depende de una región en el extremo N-terminal, se utilizó como modelo a la versión truncada IsIA4, que tiene una zona de 100 aminoácidos en el extremo N-terminal, conocida como región N₁₀₀ terminal, y a la versión IsIA5, que carece de dicha región. La comparación entre ambas enzimas truncadas reveló que la remoción de la región N₁₀₀ terminal afecta propiedades como la temperatura óptima, la velocidad inicial de la enzima, y probablemente las constantes cinéticas, así como la actividad enzimática. Sin embargo, el resultado más sorprendente es que la región N₁₀₀ terminal no participa en la procesividad de la enzima, ya que se identificó la síntesis de polímero de alto peso molecular en la enzima carente de dicha región.

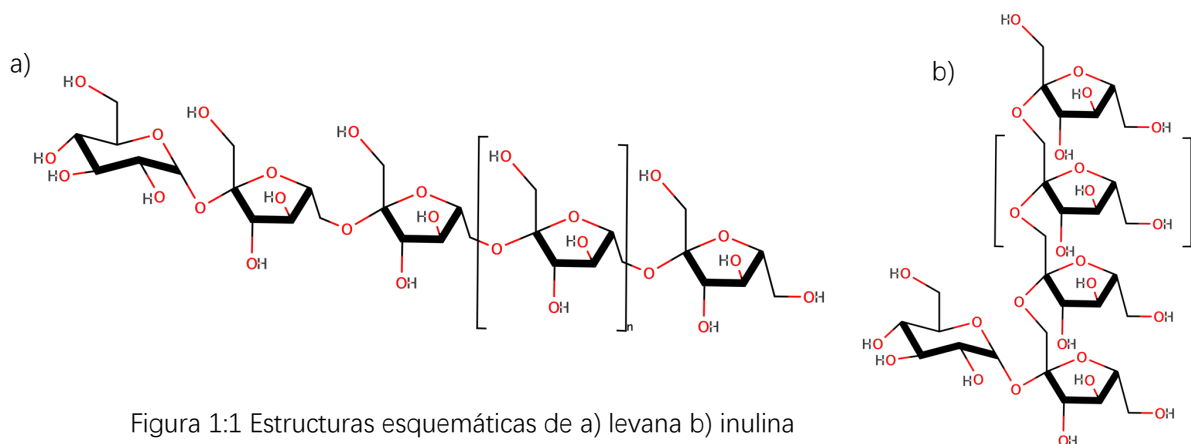
El trabajo concluye que la región N₁₀₀ terminal no es indispensable para la procesividad de la enzima. Es probable que las determinantes que definen la procesividad dependan de la estructura del sitio catalítico y no de la intervención de regiones o dominios adicionales.

1. ANTECEDENTES

1.1 FRUCTANAS

Las fructanas son polímeros de fructosa unidos mediante enlaces glicosídicos, con una unidad de sacarosa en el extremo no reductor. Dependiendo del tipo de enlace, pueden clasificarse como levanas, cuando la cadena principal presenta enlaces β -(2,6) y ramificaciones β -(2,1); o como inulinas si la cadena principal se compone de enlaces β -(2,1) con ramificaciones en β -(2,6) (Figura 1:1).

Estos polímeros son producidos por plantas de floración incluyendo dicotiledóneas y monocotiledóneas, bacterias de los géneros *Bacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, entre otras y hongos de los géneros *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Penicillium*, *Fusarium*, etc [1], y han tenido grandes aplicaciones en la industria alimenticia, cosmética y farmacéutica. Por ejemplo, la inulina es utilizada como prebiótico, sustituto de grasa, modificador de textura y para el desarrollo de alimentos funcionales para mejorar la función gástrica mediante su papel benéfico a la salud [2]. Así mismo, de acuerdo con experimentos en animales y estudios clínicos, la inulina tiene además otros efectos benéficos, por lo que ha sido catalogada como anti-hipertensiva, anti-diabetes y anti-obesidad; regula el metabolismo de lípidos y glucosa, así como el sistema endócrino [3].



1.2 FRUCTANSACARASAS

Las enzimas responsables de la producción de estos polisacáridos son conocidas como fructansacararasas (E.C 2.4.1) (FNSs). Si su producto es la levana, son llamadas levansacararasas, LS (E.C. 2.4.1.10), mientras que aquellas que producen inulina son conocidas como inulosacararasas, IS (E.C. 2.4.1.9) [4].

Las FNSs llevan a cabo reacciones de transfructosilación al transferir un residuo de fructosa de una molécula de sacarosa a una molécula aceptora. Dicha reacción involucra en el primer paso la interacción de la enzima con una molécula donadora como la sacarosa y la formación de un intermediario covalente fructosil-enzima, con la consecuente liberación de la glucosa al medio de reacción y finalmente, la transferencia del residuo fructosilo a una molécula aceptora. Si en esta reacción, la molécula aceptora que rompe el enlace covalente fructosil-enzima es una molécula de sacarosa se obtienen fructooligosacáridos (FOS), si es una cadena creciente de fructana se obtiene un polímero de fructosa (Figura 1:2). Por otra parte, si la molécula aceptora es el agua, la reacción catalizada es la hidrólisis de la sacarosa y los productos serán glucosa y fructosa [5]. El residuo fructosilo también puede ser transferido a otros aceptores exógenos a la reacción como alcoholes primarios o azúcares como D-xylosa, D-arabinosa, L-arabinosa, maltosa, malttriosa, celobiosa melibiosa o lactosa [4].

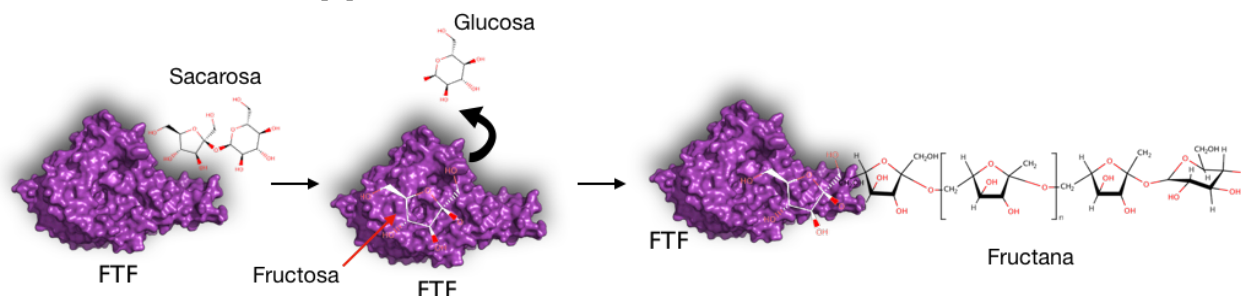


Figura 1:2 Representación del mecanismo de catálisis de las fructosiltransferasas

Las FNSs bacterianas son producidas tanto por bacterias Gram negativas como por Gram positivas. Dentro de esta últimas destacan *Bacillus subtilis*, *Streptococcus salivarius*, *Leuconostoc citreum*, *Lactobacillus reuteri* 121 y *Streptococcus mutans* [6]–[9].

En la naturaleza existen enzimas FNSs bacterianas, unidominio y multidominio. En general, el dominio catalítico de estas FNSs tiene un tamaño de entre 45 a 65 kDa. Su estructura presenta un plegamiento tipo β -propela con una cavidad central tipo embudo con carga negativa en cuyo interior se hospeda al sitio activo, conformado por la triada catalítica (Figura 1:3) [10].

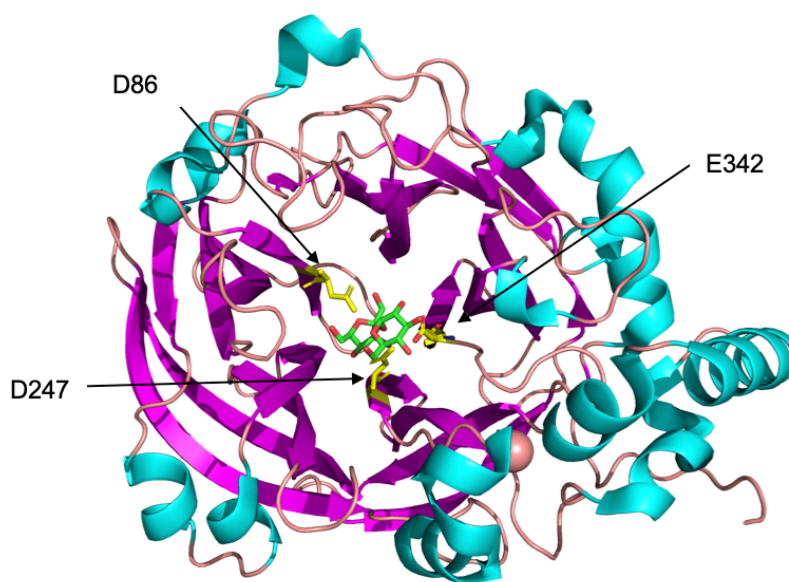


Figura 1:3 Estructura del dominio catalítico de las FNSs. Residuos catalíticos mostrados en amarillo, ligando (sacarosa) en verde y estructura de β -propela en magenta

Estudios cristalográficos de la LS unidominio de *Bacillus subtilis* (SacB), han permitido identificar que en el sitio activo existen subsitios denominados -1, +1 y +2 que participan en el acomodo del sustrato [11]. El mecanismo molecular de reacción de estas enzimas comienza cuando el sustrato donador, por lo general la sacarosa,

se une a los subsitios de unión al sustrato -1 y +1; el subsitio -1 es específico para la fructosa mientras que en el subsitio +1 se acomoda la glucosa (Figura 1:4).

Después del rompimiento del enlace glicosídico, la glucosa es liberada al medio de reacción, mientras la fructosa se mantiene unida a la enzima en el subsitio -1 formando un intermediario fructosil-enzima. El aceptor, que en los primeros pasos de elongación es otra molécula de sacarosa, se acopla en los subsitios +1 y +2 para que la fructosa pueda ser transferida al aceptor [11], [12]. Se ha propuesto que los subsitios +1 y +2 resultan ser menos específicos, permitiendo así la unión de otros azúcares que actúan como aceptores [13].

De acuerdo con Davies y Henrissat (1995), la especificidad de sustrato y el modo de acción de las glicosido-hidrolasas (GH) dependen de los detalles estructurales, tales como la presencia de estructuras en forma de α -hélices o loops [11], [14], más que del plegamiento global. La hidrólisis enzimática de los enlaces glicosídicos tiene lugar a través de un mecanismo general de catálisis ácida, que requiere de dos residuos críticos: un donador de protones y una base/nucleófilo [15]. Los datos cristalográficos de SacB muestran que los residuos D86 y E342 representan al nucleófilo catalítico y al residuo ácido/base general, respectivamente. Así, mientras que el residuo E342 protona el oxígeno del enlace glicosídico, el residuo D86 realiza un ataque nucleofílico que lleva a la formación de un intermediario covalente. Se ha descrito que en la formación de dicho intermediario participa un tercer residuo, conocido como el estabilizador del estado de transición, que para el caso de SacB fue identificado como el residuo D247 (Figura 1:5) [16], [17].

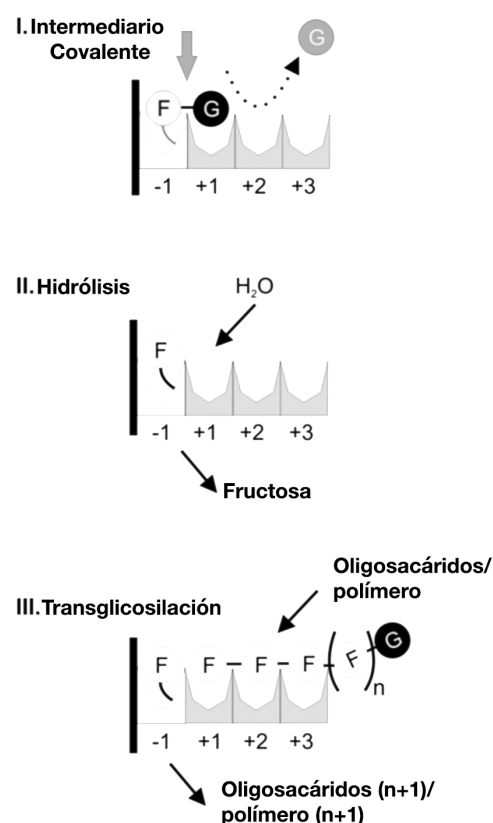


Figura 1:4 Subsitios en el dominio catalítico de las FTF. *Imagen tomada y modificada de Pijning, 2001*

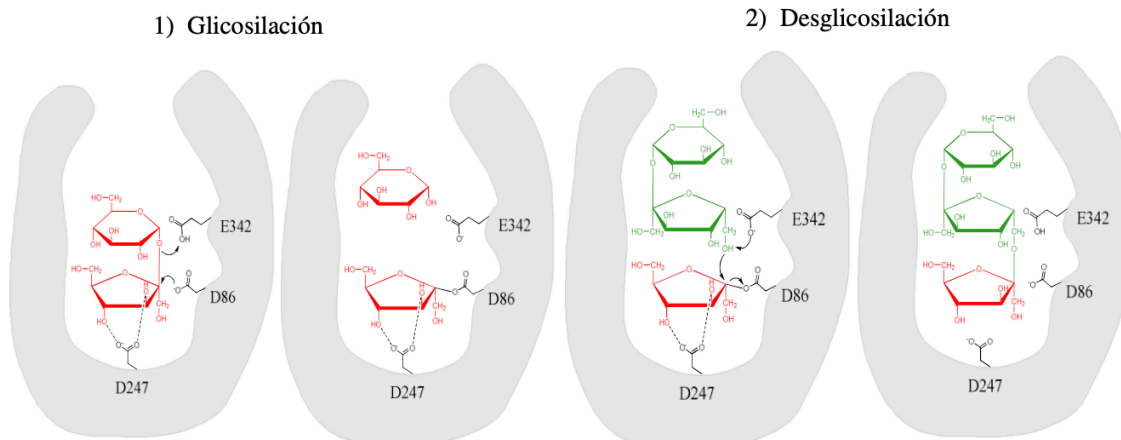


Figura 1:5. Esquema del mecanismo molecular de catálisis de SacB. Tomado de *Raga-Carbajal, 2019* y adaptado de *Chuankhayon et al, 2010*

La conservación de los residuos que conforman la triada catalítica entre enzimas que llevan a cabo reacciones de hidrólisis y transfructosilación mediante un mecanismo de doble desplazamiento, así como las similitudes observadas en la estructura en forma de β -propela del dominio catalítico, han permitido la agrupación de estas enzimas en la familia GH68 en la base de datos de enzimas activas a carbohidratos, CAZy. Esta familia, junto con la familia GH32, comprenden el clan GH-J de las β -fructofuranosidasas, caracterizado por compartir la identidad de los residuos catalíticos y un mecanismo de reacción similar [5], [18]. No obstante, es importante mencionar que la principal diferencia entre la familia GH68 y GH32 es que las enzimas de esta última familia presentan, además de un plegamiento en forma de β -propela, un dominio extra en el extremo C-terminal con un plegamiento tipo sándwich, que resulta esencial para la estabilidad de estas proteínas [19].

1.3 MECANISMO DE ELONGACIÓN DE FRUCTANAS

La transferencia de monómeros de fructosa puede efectuarse mediante un mecanismo de elongación procesivo o no procesivo [9]. En el primero, los monómeros de fructosa son incorporados sucesivamente a una misma cadena y el proceso de elongación termina cuando la enzima libera al producto, el cual se caracteriza por ser un polímero [9], [12] (Figura 1:6A).

En el caso del mecanismo no procesivo, las unidades de monómero son añadidas a una molécula que es tomada del medio en función de la afinidad de ésta por la enzima. En este particular caso, hay acumulación de intermediarios con diferente grado de polimerización [9], [12] (Figura 1:6B).

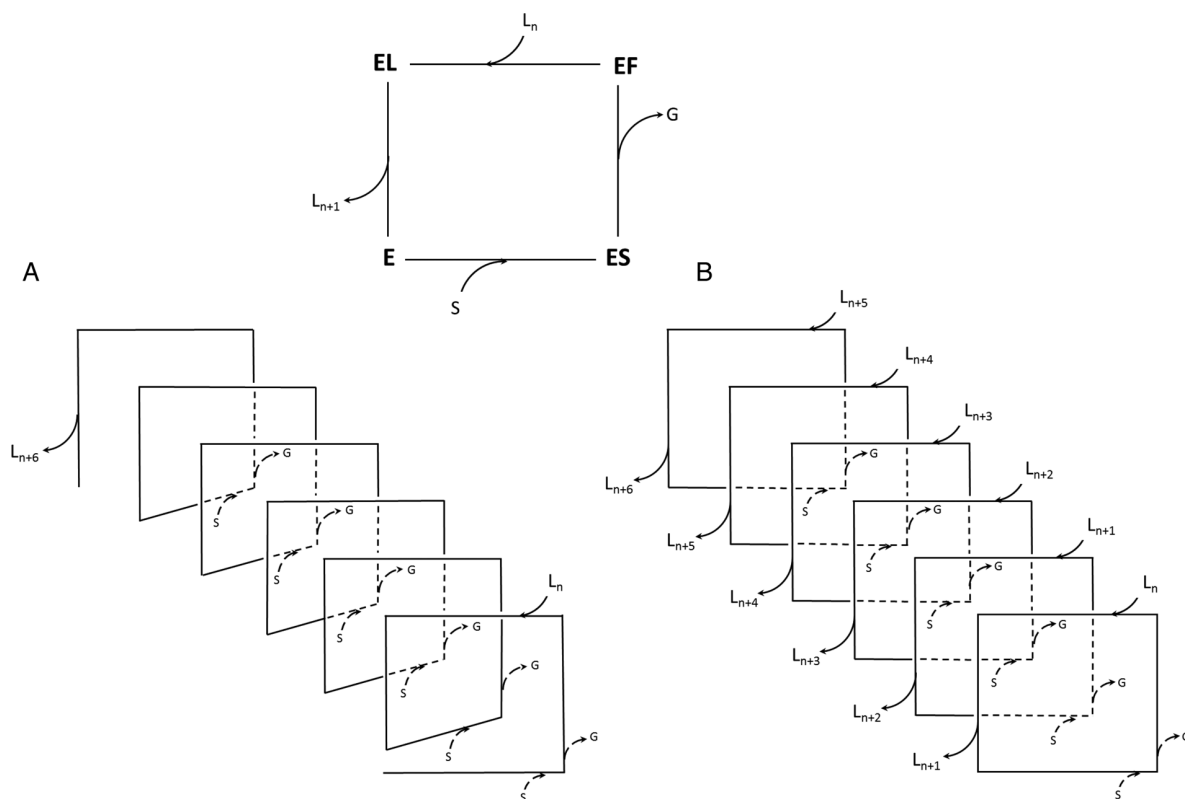


Figura 1:6 Equema del mecanismo de elongación de las FTFs. A) Mecanismo de elongación procesivo. B) Mecanismo de elongación no procesivo. *Imagen tomada de Raga-Carbajal et al, 2016*

1.4 FRUCTANSACARASAS MULTIDOMINIO

Las FNSs multidominio (FNSs-MD) son una subfamilia de enzimas presente en la familia GH68 (inulosacararas y levansacararas). Estas enzimas se caracterizan por presentar dominios adicionales en las regiones N- y C-terminal que flanquean al dominio catalítico, alcanzando tamaños mayores a los 170 kDa. (Figura 1:7) [20], [21].

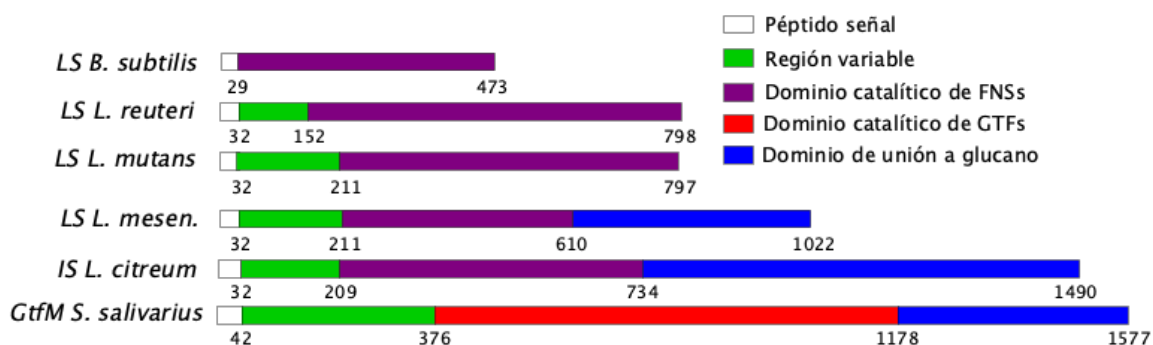


Figura 1:7 Comparación de la estructura primaria de FNSs multidominio contra una FTF unidominio (LS de *B. subtilis*).

La descripción de los dominios adicionales se presenta a continuación:

Región N-terminal. Dado que las FNSs son enzimas extracelulares, la región N-terminal contiene un péptido señal para la secreción de la proteína (36 a 40 aminoácidos). Por otra parte, se ha demostrado que en algunos casos la región N-terminal tiene similitud con la región N-terminal de las glucansacararas (GNSs), que son enzimas que catalizan la formación de glucanos (polímeros de glucosa) a partir de la sacarosa con liberación de fructosa al medio. Se ha demostrado que la región N-terminal en las GNSs no determina la estructura del glucano y al ser eliminado, disminuye la actividad enzimática [20].

Dominio catalítico. La estructura del dominio catalítico de las FNSs es similar a la estructura completa de una FNSs unidominio (como SacB, Figura 1:7), una cavidad

en forma de embudo, rodeada por cinco β -propelas donde se encuentran los residuos catalíticos, y cuya identidad oscila entre el 43% y 56% [4], [10], [22].

Dominio C-terminal. En algunas enzimas la función de este dominio es el anclaje de dichas enzimas a la pared celular, a través del motivo LPXTG. La presencia de dicho motivo se ha reportado en GNSs y en algunas FNSs, como en la de *L. reuteri*, pero no existe en la inulosacarasa de *L. citreum*. Para la FNS de este microorganismo se ha reportado una región de unión a pared celular conformada por series de secuencias repetidas en tándem de 20-30 aminoácidos [20], conocidas como repetidas GW [4]. Estas secuencias fueron inicialmente reportadas en proteínas de superficie críticas para el proceso infeccioso de *Listeria monocytogenes*, siendo nombradas de esta forma debido a que todas las secuencias comienzan con el dipéptido GW [23].

Al igual que con la región N-terminal, el dominio C-terminal de algunas FNSs tiene similitud con el dominio C-terminal de las GNSs, donde este dominio es conocido como dominio de unión a glucano (GBD). En las GNSs, tal dominio se ha asociado con la polimerización y estructura del glucano, en la transferencia de productos desde el sitio catalítico y en la localización en la superficie celular (9,13). Al igual que en las GNSs, en las FNSs se ha propuesto que este dominio pudiera afectar el tamaño y/o especificidad del producto [20].

1.5 ASPECTOS GENERALES DE LA INULOSACARASAS

A diferencia de las levansacararas, que se pueden encontrar en una gran cantidad de microorganismos, las inulosacararas (IS) han sido reportadas en menor cantidad y en su mayoría en microorganismos Gram positivos, como *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc citreum* o *Streptomyces viridochromogens* [24]. Pese a que se ha encontrado que estas inulosacararas comparten características estructurales similares, como la conservación de los residuos catalíticos y la estructura de la β -propela, se ha evidenciado una gran diversidad en la arquitectura y en el peso molecular de las mismas, encontrando enzimas unidominio de tan sólo 47 kDa [10], [25] hasta inulosacararas multidominio de 165 kDa [26] (Figura 1:8).

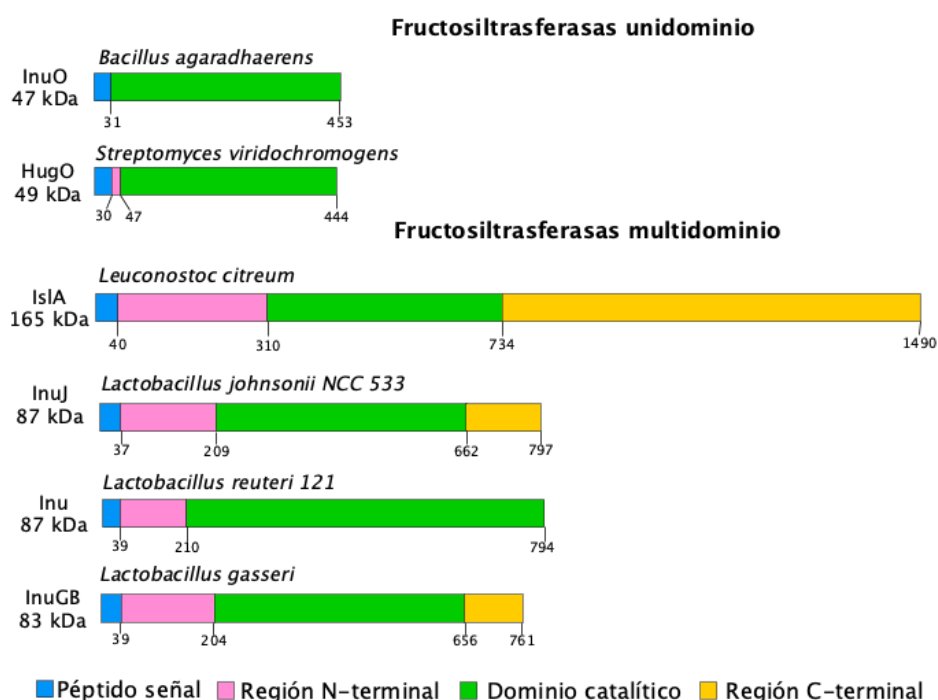


Figura 1:8 Esquema de algunas inulosacararas caracterizadas entre 2007 y 2018

Así mismo, el espectro del tamaño de los productos de estas enzimas parece no tener relación directa con la arquitectura de las mismas, ya que se ha reportado que inulosacararas como las de *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus reuteri* 121 y

Lactobacillus reuteri TMW 1.106, que presentan un arquitectura multidominio, son capaces de producir polímeros de alto peso molecular (de hasta 1×10^7 Da) [8], [27], pero no FOS, mientras que otras como InuO e InuGB de *Bacillus agaradhaerens* y *Lactobacillus gasseri*, que presentan una arquitectura unidominio y multidominio respectivamente, producen sólo FOS, con un grado de polimerización de hasta 13 y 24, respectivamente [10], [25]. Algunas otras, tales como las IS de *Bacillus* sp. 217C-11, *L. johnsonii* o la IS unidominio HugO de *S. viridochromogens*, son capaces de producir ambas clases de productos.

Estos datos sugieren que no existe un determinante general para las inulosacararas que dirija la síntesis de uno u otro tamaño de producto, y en cambio, deben ser estudiadas de forma individual para entender su comportamiento. El resumen de los datos se muestra en la Tabla 1:1.

Tabla 1:1 Características estructurales y productos sintetizados por las inulosacararas.

Microorganismo	Enzima	Peso molecular	Arquitectura	Producto/ tamaño	Referencia
<i>S. mutans</i> GS-5	FTF- MBP	Entre 97.4 y 200 kDa	ND	Polímero de alto peso molecular (60×10^6 - 90×10^6)	(5,24)
<i>L. reuteri</i> 121	Inu	87 kDa, 798 aa	Multidominio	$>1 \times 10^7$ Da Inulina de alto peso molecular	(6,25,26)
<i>Bacillus</i> sp 217C- 11	IPE	44-45 kDa	ND	Polímero y FOS con un DP 10-25	[8]
<i>L. reuteri</i> TMW 1.106	Inu	ND	ND	Polímero de alto peso molecular	[30]
<i>L. citreum</i>	IsIA	165 kDa, 1490 aa	Multidominio	Polímero de alto peso molecular (3,000 kDa)	[4], [22]

<i>L. johnsonii</i> NCC 533	InuJ	87.2 kDa, 797 aa	Multidominio	Inulina <i>in situ</i> (4×10^7 Da) y FOS (GF2-GF15)	[11], [31]
<i>L. gasseri</i>	InuGB	83 kDa, 761 aa	Multidominio	FOS (GF2 – GF13)	[32]
<i>S. viridochromogens</i>	HugO	49 kDa, 443 aa	Unidominio	FOS (<i>in vivo</i>) y polímero de 2.5×10^7	[10]
<i>B. agaradhaerens</i>	InuO	47.4 kDa 453 aa	Unidominio	FOS (GF2-GF24)	[25]

ND= No determinada/ no reportada

Adicionalmente, se han encontrado algunas diferencias en las características bioquímicas de estas enzimas, como que la mayoría de estas IS trabajan adecuadamente a temperaturas que van desde los 45°C hasta los 60°C, excepto la IS de *L. citreum*, cuya temperatura óptima es de 35°C [22]. Por otra parte, el pH óptimo de trabajo para las IS abarca un amplio rango de valores, los cuales van desde pH 3.5 – 4.5 para InuGB [32] hasta pH 10.0 para InuO [25]. Toda la información de las propiedades bioquímicas se resume en la Tabla 1:2.

Tabla 1:2 Propiedades bioquímicas de las inulosacararas

Microorganismo	Enzima	pH / Temp. optima	Referencia
<i>S. mutans GS-5</i>	FTF-MBP	5.7-7.2 / NC	(5,24)
<i>L. reuteri 121</i>	Inu	5.0 – 5.5 / 50°C	(6,25,26)
<i>Bacillus sp 217C-11</i>	IPE	7.0- 8.0 / 45°C	[8]
<i>L. reuteri TMW 1.106</i>	Inu	NC	[30]
<i>L. citreum</i>	IsIA	6.5 / 35°C	[4], [22]
<i>L. johnsonii NCC 533</i>	InuJ	4.5 – 7.0 / 55°C	[11], [31]

<i>L. gasseri</i>	InuGB	3.5 – 4.5 / 55°C	[32]
<i>S. viridochromogens</i>	HugO	5.0 – 7.0 / 50-55°C	[10]
<i>B. agaradhaerens</i>	InuO	6.0 - 10.0 / 60°C	[25]

NC = No caracterizado/ sin información en la literatura

En general, el comportamiento cinético de estas enzimas no puede ser descrito con el modelo de Michaelis-Menten, tal como se reportó para las IS de *Bacillus agaradhaerens*, *L. reuteri* 121, *L. johnsonii* NCC 533. y *L. gasseri*. De acuerdo con la literatura, ninguna de estas enzimas llegó a la saturación con altas concentraciones de sacarosa cuando la actividad total y transglucosilasa fue evaluada [10], [29], [31], [32], sin embargo, este comportamiento se ajustó a la ecuación de Hill, con un valor cercano a 1, para las IS de *L. reuteri* 121, *L. johnsonii* NCC 533 y *L. gasseri*.

Finalmente, sólo se tiene conocimiento de la estructura cristalográfica de la IS de *L. johnsonii*, InuJ, por lo que mucha de la información conocida sobre las IS se basa en dicho modelo (Figura 1:9).

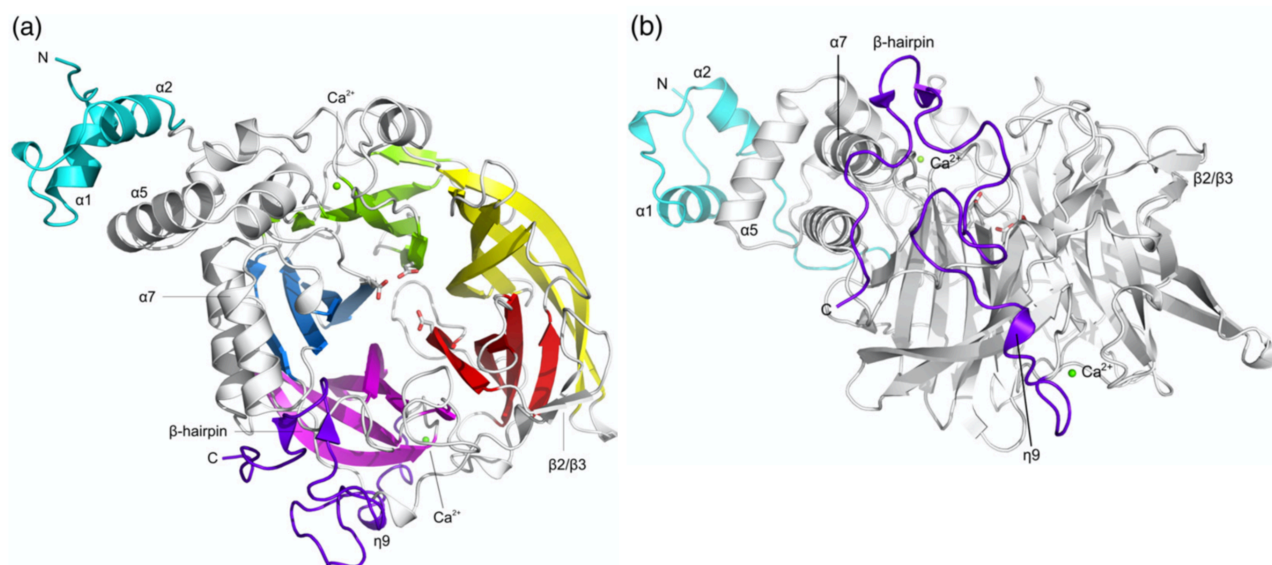


Figura 1:9. Estructura cristalográfica de la inulosacarasa de *Lactobacillus johnsonii*, InuJ.

La elucidación de la estructura cristalográfica de InuJ permitió confirmar que el sitio y modo de unión de la sacarosa es idéntico al de las LSs y confirmó que ambos tipos de enzimas usan la misma red estructural para la unión y rompimiento del sustrato donador en el sitio activo. En comparación con SacB, la entrada a la estructura en forma de embudo donde se encuentra el sitio catalítico es más angosto como resultado de la sustitución del residuo K363 en SacB, por el residuo R545 en InuJ. Por otra parte, la orientación del sustrato (sacarosa) es muy similar con aquella observada en SacB, con similares ángulos de torsión de los enlaces glicosídicos.

En InuJ, la sacarosa tiene numerosas interacciones directas con puentes de hidrógeno y con cadenas laterales de residuos conservados en la familia GH68; y estas interacciones son las mismas que aquellas observadas en SacB. Así, por ejemplo, el residuo fructosilo en el subsitio -1 esta fuertemente unido a siete puentes de hidrógeno, y mientras el C2 de la fructosa esta localizado a 3.5 Å del residuo nucleofílico (D272), el oxígeno del enlace glicosídico se localiza a 3.3 Å del residuo ácido/ base general (E524) y los O3' y O4' de los grupos hidroxilos del residuo fructosilo se localizan a una distancia de enlace de hidrógeno con el estabilizador del estado de transición D425, mientras que en el subsitio +1, los residuos 2-OH, 3-OH y 4-OH del residuo glucosilo están a una distancia de enlace de hidrógeno de las cadenas laterales E522, E524 (ácido/base general) y R542 [11].

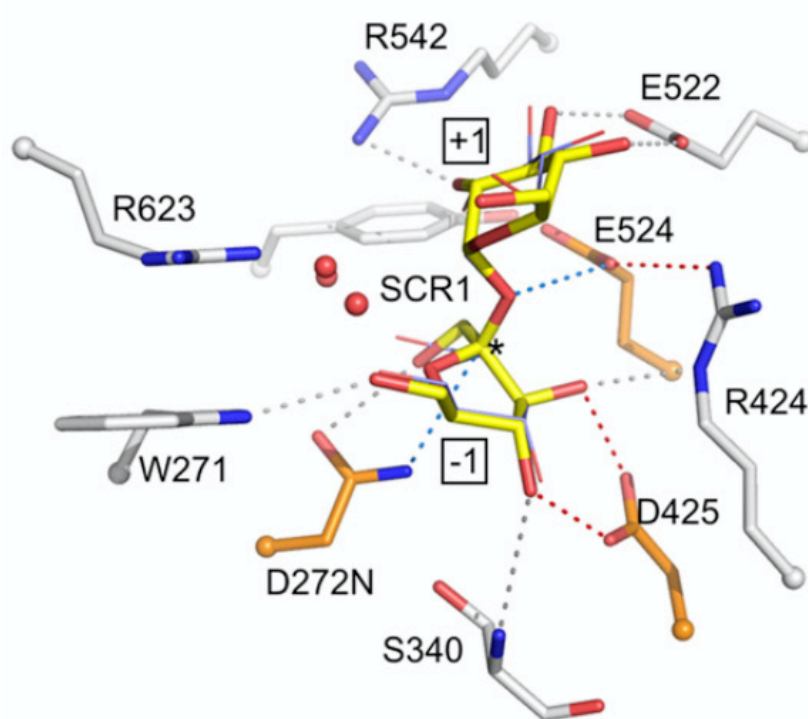


Figura 1:10. Interacciones de residuos de los subsitos -1 y +1 con la sacarosa (SCR1) en el sitio activo de InuJ. Residuos catalíticos en naranja, el C2 de la fructosa marcado con un *, puentes de hidrógeno en gris. Figura tomada de *Pijning et al, 2011*.

1.6 INULOSACARASA DE *LEUCONOSTOC CITREUM* CW28 (IsIA)

En 2003, Olivares-Illana y cols. reportaron la primera FNS-MD, aislada de *Leuconostoc citreum* CW28 (IsIA). Se trata de la FNSs más grande descrita a la fecha, con una secuencia de 1490 aminoácidos y un peso molecular de 165 kDa [22]. Como en las FNSs multidominio, la estructura de IsIA esta conformada por un dominio N-terminal (aminoácidos 1 a 310), que contiene un péptido señal, de 40 aminoácidos, necesaria para la secreción de la proteína. La región N-terminal tiene un 40% de identidad con la alternansacarasa (ASR), una GNS de *L. mesenteroides* NRRL B-1355 capaz de producir glucano con enlaces alternos α -1,3 y α -1,6. Adicionalmente, la enzima IsIA presenta una región variable, con una similitud del 36% con la ASR. Diversos alineamientos de secuencia han demostrado que dicha región variable no esta conservada entre las GNSs.

Al dominio N-terminal le sigue el dominio catalítico (aminoácidos 311 a 734), el cual presenta una identidad del 43-56% con otras FNSs y una similitud de entre el 28-38%, y posterior al dominio catalítico, se encuentra la región de transición (aminoácidos 735 a 940) que presenta baja identidad con la ASR. Finalmente, la región C-terminal (aminoácidos 941 a 1490), la cual presenta un 80% de identidad con el GBD de la ASR (Figura 1:11) [4], [22].

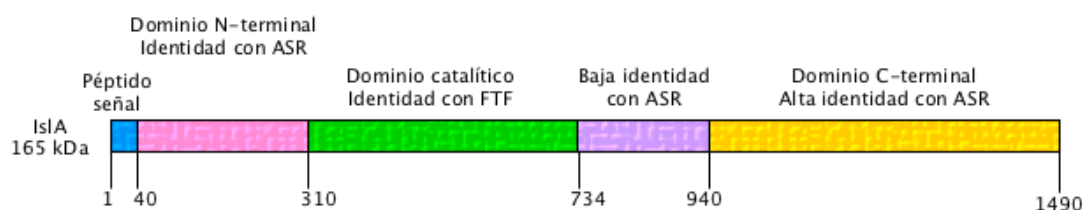


Figura 1:11 Representación de la inulosacarasa de *Leuconostoc citreum* CW28 (IsIA).

Imagen tomada y modificada de Olivares-Illana et al, 2003

En este contexto, la inulosacarasa podría ser vista como una ASR (GNS) en donde el dominio catalítico fue reemplazado por el de una FNS, o como una FNS a la que se le añadieron las regiones N- y C-terminal de la alternansacarasa [4], dado que presenta regiones con alta identidad y similitud con la ASR, así como un considerable porcentaje de identidad con otras fructosiltransferasas.

1.7 ESTUDIO DE RELACIÓN ESTRUCTURA / FUNCIÓN DE LOS DOMINIOS ADICIONALES DE LA INULOSACARASA (ISLA) DE *LEUCONOSTOC CITREUM* CW28

Desde su descubrimiento en 2003 [4], se han realizado diversos estudios para entender la influencia de los dominios adicionales de la inulosacarasa de *Leuconostoc citreum* CW28 (IsIA) en los parámetros bioquímicos y en el mecanismo de catálisis. Para desarrollar estos análisis, diversas versiones truncadas de esta enzima fueron creadas [4], [13], [22] y expresadas de forma heteróloga (Figura 1:12). IsIA2 es una versión truncada que carece de la región C-terminal y tiene un peso molecular de 102 kDa, mientras que IsIA3 es una enzima que carece de la región C-terminal y de la región de transición, con 80 kDa. Por otro lado, IsIA4 es un fragmento de 64 kDa a la que se le removieron el dominio C-terminal, la región de transición y una parte del dominio N-terminal (aminoácidos 1 a 209), quedando solo la región N₁₀₀ terminal. También se creó la versión alterna Δ NIsIA2, la cual es una combinación de IsIA2 e IsIA4, pues carece del dominio C-terminal y de los primeros 209 aminoácidos de la región N-terminal (Figura 1:12).

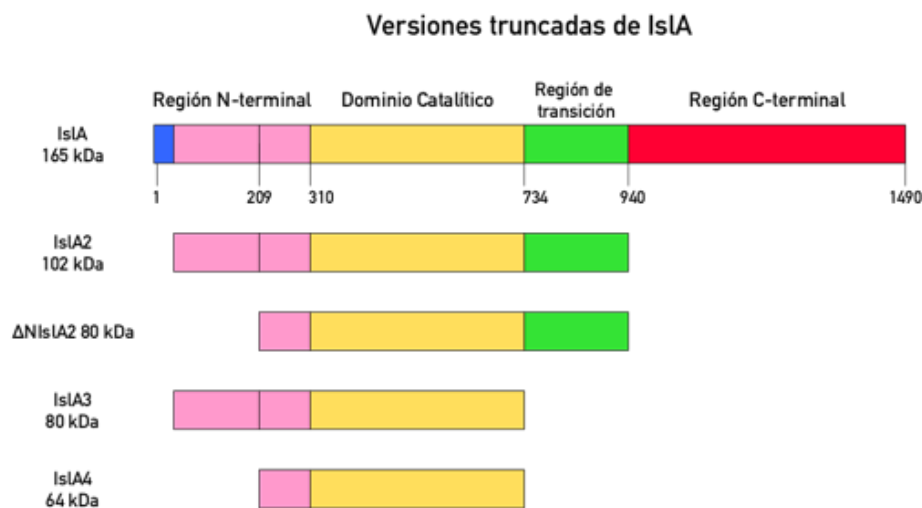


Figura 1:12 Versiones truncadas construidas a partir de la inulosacarasa de *Leuconostoc citreum* CW28 (IsIA)

Del Moral y cols., en 2008 realizaron estudios de la caracterización de las enzimas silvestre y truncadas, así como la determinación de los parámetros bioquímicos de las mismas. IslA tiene una temperatura óptima de 35°C, sin embargo, esta desciende hasta 30°C en las versiones truncadas más pequeñas IslA3 e IslA4 (Tabla 1:3). No obstante, mientras que IslA2 tiene el mayor valor de vida media, a medida que se eliminan dominios, este parámetro disminuye en las versiones truncadas. Estos resultados demuestran que los dominios N- y C-terminal contribuyen a la termoestabilización de la enzima [33]. Adicionalmente, se encontró que el dominio C-terminal es responsable del anclaje de la enzima a la célula, pues como ya se mencionó con anterioridad, cuenta con las secuencias repetidas en tándem GW, también asociadas al anclaje de la pared celular [22].

La relación hidrólisis/transferencia también se modifica, pues las versiones truncadas más pequeñas muestran una mayor tasa de hidrólisis (Tabla 1:3), probablemente debido a que carecen del dominio C-terminal. Así mismo, los resultados muestran que dicho dominio no es esencial para la actividad catalítica. Cabe mencionar que, al menos para IslA4 se observa que, si bien aumentó la actividad catalítica hasta 4 veces en comparación con IslA, la reacción de transferencia disminuyó considerablemente. En el resto de las versiones truncadas, este cambio no es significativo o no pudo ser determinado [4], [22], [33].

El comportamiento de las versiones truncadas (con excepción de IslA 3, cuya cinética es descrita por la ecuación de Hill) exhiben un comportamiento que se ajusta al modelo de Michaelis-Menten. No obstante, se observó que las versiones más pequeñas (IslA3 e IslA4) pierden afinidad por su sustrato, haciéndolas equivalentes, en términos de la K_m , a las levansacarasas de dominio sencillo [22]. Estos resultados podrían sugerir que la eliminación de dominios adicionales afecta las propiedades cinéticas, específicamente la afinidad de la enzima por su sustrato y la eficiencia catalítica (K_{cat}). Un resumen de los parámetros cinéticos y bioquímicos se muestran en la Tabla 1:3.

Tabla 1:3 Resumen de las propiedades bioquímicas de IsIA y sus versiones truncadas

Enzima	T óptima (°C)	Tiempo de vida media (min)	Relación hidrólisis/ transferencia (%)	Km (mM)	K _{cat} (s ⁻¹)	Kcat/km (mM ⁻¹ s ⁻¹)	Referencia
IsIA	35	42	40/60	38	25	0.66	Olivares-Illana et al, 2003
IsIA2	35	408	36/62	24	28.19	1.17	Olivares-Illana et al, 2003; Del Moral et al, 2008
ΔNIsIA2	35	60	45/55	18	29.6	1.64	Del Moral et al, 2008
IsIA3	30	348	61/39	ND	ND	ND	Olivares-Illana et al, 2003; Del Moral et al, 2008
IsIA4	30	126	70/30	142	105	0.74	Rodríguez-Alegria et al, 2010; Del Moral et al, 2008

Finalmente, se observó que todas las versiones truncadas analizadas hasta el momento son capaces de producir polímero de tipo inulina, demostrando que los dominios adicionales no influyen en la especificidad de enlace [22].

1.8 FUNCIÓN DE LOS DOMINIOS N-TERMINAL Y C-TERMINAL EN LAS GLUCANSACARASAS

Para entender cuales son los determinantes responsables de la especificidad de producto, se han llevado a cabo diferentes estudios tanto en enzimas de la familia GH68, como de la familia GH70. Los miembros de la familia GH70, que como ya fue mencionado anteriormente, son enzimas homólogas funcionales a la familia GH68, tienen la capacidad de transferir unidades de glucosa a cadenas crecientes de glucano de forma lineal o ramificada, con enlaces de tipo α (23). La estructura de las glucansacarosas se describe con la forma de una herradura (en U), la cual esta conformada por los dominios A, B, C, IV y V (Figura 1:13).

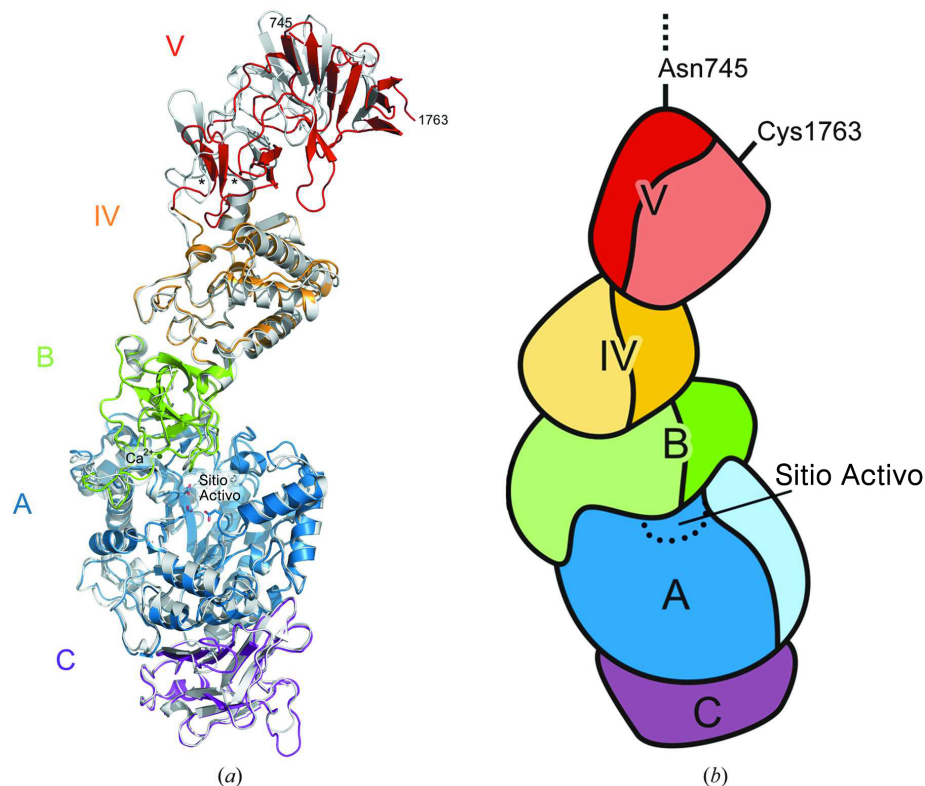


Figura 1:13 a) Estructura de la GTF de *L. reuteri* 121 (GTFA). b) Arreglo esquemático de los dominios de GTFA. Imagen tomada de *Pljning et al, 2012*.

Excepto por el dominio C, cada dominio está formado por dos cadenas polipeptídicas discontinuas correspondientes a las regiones N- y C-terminal. Dichas regiones se unen a través de dos tipos de contactos intermoleculares: interacciones del tipo “cabeza-cola” entre los dominios V y C, e interacciones de tipo “lado a lado” entre dominios [34]. Este último tipo de interacciones se dan principalmente entre los dominios IV y B, y en menor medida con el dominio V, así como entre los dominios A y B. Se ha identificado que la interacción entre dominios lleva a la formación de subsitios de unión importantes para la actividad enzimática, unión del sustrato y elongación del polímero [34]–[36], y cuando algún extremo es truncado, estas interacciones se ven fuertemente afectadas [37].

En estudios de relación estructura / función de la glucansacarasa de *Lactobacillus reuteri* 180, se observó que la síntesis de polímero se vio gravemente afectada cuando una parte de la región N-terminal fue removida, y las propiedades cinéticas y la capacidad de sintetizar polímero fueron fuertemente afectadas tras la remoción del dominio V de dicha enzima [37]. De la misma forma, la eliminación del dominio V en la dextransacarasa de *Leuconostoc. citreum* NRRL B-1299 resultó en la disminución de la concentración de dextrano sintetizado [38]. Estos resultados proponen que los dominios adicionales, y específicamente la región N-terminal está involucrada en la síntesis de polímero en las GNSs y su remoción es capaz de afectar también las constantes cinéticas de estas enzimas.

1.9 EFECTO DE LOS DOMINIOS ADICIONALES EN LA PROCESIVIDAD DE FRUCTANSACARASAS

Los efectos de truncar dominios también fueron observados y reportados para la levansacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* B512F (LevS), por García-Paz (tesis de doctorado en proceso), quien llevó a cabo el estudio de los dominios adicionales de dicha enzima, a través de versiones truncadas, representadas en la Figura 1:14.

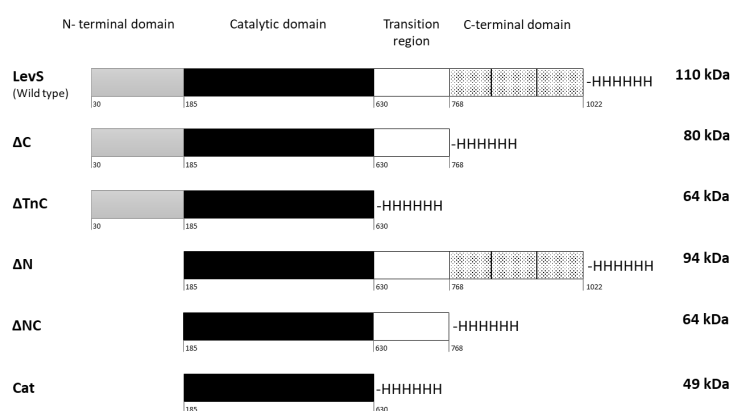


Figura 1:14 Representación esquemática de las versiones truncadas de LevS. Imagen tomada de García-Paz, *datos no publicados*.

La caracterización bioquímica de las enzimas truncadas mostró una disminución en la actividad específica cuando la región C-terminal y la región de transición son eliminadas. La relación hidrólisis/transferencia también se vio afectada con un aumento de hasta el 85% en la actividad hidrolítica cuando se eliminó la región de transición. No obstante, el cambio más importante se observó al remover la región N-terminal. Los resultados mostraron un cambio en la especificidad de producto, de polímero de alto peso molecular (pAPM) a polímero de bajo peso molecular (pBPM) [39].

Para profundizar en este estudio, Martínez-Bahena (2020) delimitó la región N-terminal mínima necesaria capaz de conservar la procesividad de la misma enzima

y concluir si el efecto observado es producto de la eliminación completa de la región N-terminal, o si existe alguna zona clave para el cambio en el perfil de productos. El trabajo concluye que con sólo 70 aminoácidos en la región N-terminal la enzima mejora su actividad transferasa y conserva su procesividad, siendo capaz de producir polímero de alto peso molecular (pAPM) de tipo levana en proporciones similares a la enzima silvestre [40]. Debido a la importancia de la región de 70 aminoácidos en la región N-terminal en la procesividad, esta región fue denominada zona de procesividad.

1.10 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como se mencionó anteriormente, diversos estudios de relación estructura / función se han llevado a cabo para comprender como las regiones adicionales intervienen en las capacidades catalíticas, la especificidad de reacción y la distribución de productos de la inulosacarasa IsIA de *L. citreum* CW28 [22], [33], [41]. En este sentido, la version truncada más pequeña que cuenta con el dominio catalítico (IsIA4) es capaz de sintetizar inulina de alto peso molecular de forma eficiente y también cuenta con 100 aminoácidos de la región N-terminal. Es probable que esta región este jugando un papel importante en la procesividad, de la misma forma que la región de 70 aminoácidos de la levansacarasa LevS y la región N-terminal en las glucansacarosas, por lo que este trabajo se enfoca en determinar el papel que juega la región N₁₀₀ terminal en el mecanismo de elongación de la inulosacarasa IsIA.

2. JUSTIFICACIÓN

Estudios realizados en otras fructansacarosas y glucansacarosas sugieren que la región N-terminal que flanquea al dominio catalítico participa en la procesividad de la enzima. Estudios de la región N₁₀₀ terminal permitirán demostrar si esta región está involucrada en el mecanismo de elongación en la inulosacarasa de *L. citreum* CW28. La elucidación de los determinantes involucrados en la elongación del polímero llevado a cabo por las fructansacarosas es importante para la generación de conocimiento sobre funcionamiento de estas enzimas, lo que podría llevar a la generación de biocatalizadores capaces de sintetizar fructanas.

3. HIPÓTESIS

La región N₁₀₀ terminal de la inulosacarasa de *Leuconostoc citreum* CW28 (IsIA) es la responsable de la procesividad de la enzima, por lo que, al eliminarla, la enzima producirá exclusivamente productos de bajo peso molecular.

4. OBJETIVO

4.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la influencia de la región N₁₀₀ terminal del dominio N-terminal de la inulosacarasa truncada IslA4 de *Leuconostoc citreum* CW28 en el mecanismo de elongación.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar bioquímicamente a la versión truncada carente de la región N₁₀₀ terminal.
- Estudiar la influencia de la región N₁₀₀ terminal en el perfil de productos y mecanismo de elongación
- Analizar el efecto del aumento de la concentración de sustrato en el perfil de productos de las versiones truncadas con y sin la región N₁₀₀ terminal.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

1. Caracterizar bioquímicamente a la versión truncada carente de la región N₁₀₀ terminal.

- Determinar el pH óptimo.
- Determinar temperatura óptima.
- Determinar termoestabilidad al almacenamiento a 35°C.

2. Estudiar la influencia de la región N₁₀₀ terminal en el perfil de productos y mecanismo de elongación.

- Producir las versiones truncadas con y sin la región N₁₀₀ terminal.
- Determinar la actividad específica de ambas versiones truncadas en condiciones establecidas y en condiciones óptimas para la versión sin la región N₁₀₀ terminal.
- Determinar relación H/T y % de conversión de sacarosa.
- Determinar perfil de productos por TLC y HPAEC-PAD.

3. Analizar del efecto del aumento de la concentración de sustrato en el perfil de productos de las versiones truncadas con y sin la región N₁₀₀ terminal.

- Determinar relación H/T, % de conversión de sacarosa, perfil de productos y cuantificación de polímero a 1170 mM de sustrato.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MATERIAL BIOLÓGICO

6.1.1 CEPAS UTILIZADAS

Las cepas utilizadas en este trabajo se enlistan a continuación:

Tabla 6:1 Cepas utilizadas y sus características

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZ</i> YA- <i>argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) <i>phoA supE44</i> λ ⁻ <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Termofisher Scientific
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>gal dcm</i>	Termofisher Scientific
<i>E. coli</i> TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ⁻ <i>rpsL</i>(Str^R) <i>endA1 nupG</i></i>	Termofisher Scientific

6.1.2 MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Para el crecimiento de las cepas utilizadas para expresión de proteína y producción de plásmido se empleó medio Luria Bertani (Tabla 5) bajo condiciones de 37°C, 200 rpm y antibiótico a una concentración de 200 mg/ml (ampicilina) o 50mg/mL (kanamicina), según el caso.

Tabla 6:2. Composición del medio Luria Bertani (LB)

Reactivo	Concentración (g/L)
Bactotripton	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10

6.1.3 PREPARACIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES

Para la preparación de células electrocompetentes se utilizó una alícuota de 50 μ L de cada una de las cepas mencionadas anteriormente para generar un pre-cultivo en 50 mL de medio YENB (Tabla 6:3). Este se incubó de 12 a 16 h y posteriormente se agregó el 1% del pre-cultivo a un cultivo de 200 mL. El cultivo se incubó a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0.5-0.6. A continuación se centrifugó a 10,000 rpm por 20 min a 4°C y el paquete celular se resuspendió en agua Mili-Q estéril, realizando 2 lavados. Un tercer lavado se realizó con glicerol al 10%. Finalmente, el paquete celular se resuspendió en 500 μ L de glicerol al 10% para obtener alícuotas de 50 μ L. Estas se almacenaron a -80°C para su posterior uso.

Tabla 6:3. Composición del medio YENB

Reactivo	Concentración (g/L)
Bactotripton	7.5
Extracto de levadura	8

6.1.4 SOBREEXPRESIÓN Y OBTENCIÓN DE LAS VERSIONES TRUNCADAS DE ISLA EN *E.*

COLI

Para la obtención de enzima recombinante se partió de una colonia de *E. coli*, cepa TOP10 o BL21 transformada, que se inoculó en 50 mL de medio LB con el antibiótico

correspondiente. Después de incubar de 12 a 16 h, se inoculó en 1 L de LB el 1% del preinóculo y se incubó a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una D.O.600nm de 0.5 - 0.6. Posteriormente se agregó el inductor (Tabla 6:4) y se incubó durante el tiempo necesario a 120 rpm y 18°C. Una vez transcurrido el tiempo de inducción, el cultivo se centrifugó a 8,000 rpm durante 10 min a 4°C. El paquete celular se resuspendió y lavó dos veces con 20 mL de buffer de acetatos 0.05 M, CaCl₂ 1 mM, pH 6.0. Finalmente, se almacenó a -80°C para su posterior uso.

Tabla 6:4. Vectores e inductores para las diferentes versiones truncadas

Enzima	Vector	Inductor	Concentración final	Tiempo de inducción (h)
IsIA4	pET28 a (+)	IPTG	0.2mM	6
IsIA5	pET28 a (+)	IPTG	0.5mM	6

6.2 Técnicas enzimáticas y bioquímicas

6.2.1 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

6.2.1.1 PURIFICACIÓN DE ENZIMAS SOLUBLES

Para la purificación de las versiones truncadas IsIA4 e IsIA5, se parte del pellet obtenido una vez que se sobreexpresó la proteína. Se resuspendió el pellet en 10 mL de una solución de lisozima 1 mg/mL en buffer de trabajo (fosfatos 0.1 M pH 6 o buffer de acetatos 0.05 M pH 6), y se incubó por 30 min en hielo. A continuación, se congeló en hielo seco con acetona y se descongeló en agua fría tres veces. Se añadió buffer hasta un volumen de 20 mL y se sonicó con 4 pulsos de 10 s con descansos de 40 s, a una amplitud del 70%. Posteriormente se recuperó el sobrenadante por centrifugación a 9,000 rpm y 4°C por 40 min. Se resuspendió

nuevamente el pellet en 20 ml de buffer de trabajo, se sonicó de nuevo como ya fue mencionado y se repitió el proceso de lavado del pellet.

Para la purificación del sobrenadante recuperado se utilizaron dos columnas HiTrap CM sepharose FF (intercambio iónico) o HiTrap Chelating HP (cromatografía de afinidad), las cuales deben ser lavadas con 5 volúmenes de agua, 2 volúmenes de NaOH 1M y 7-10 volúmenes de agua, antes de usarse. Adicionalmente, para la columna HiTrap Chelating HP es necesario pasar de 5 a 7 volúmenes de una solución de NiSO₄ 0.1M. Las versiones truncadas IslA4 e IslA5 presentan un tag de histidinas en el extremo N-terminal y C-terminal, respectivamente.

Posteriormente la columna seleccionada debe ser equilibrada con 5 volúmenes de buffer de elución en un equipo AKTA prime. Para cargar las columnas con la fracción soluble del extracto celular se recirculó el extracto por la columna durante 20 minutos, con ayuda de una bomba peristáltica, mientras el sobrenadante se mantiene en hielo. Acto seguido, se conectó la columna al equipo AKTA prime, el cual fue previamente purgado con buffer de elución, de acuerdo con el tipo de cromatografía a utilizar: para la cromatografía de intercambio iónico se utilizó buffer de fosfatos 0.1 M pH 6 y fosfatos 1 M pH 6. Para la purificación por cromatografía por afinidad se utilizaron las soluciones A (10 mM imidazol, 20 mM Na₂HPO₄, 500 mM NaCl) y B (500 mM imidazol, 20 mM Na₂HPO₄, 500 mM NaCl) en las líneas correspondientes del equipo. La elución de la proteína purificada por intercambio iónico se realizó aplicando un gradiente de buffer de fosfatos, durante 20 min a 5 ml/min. Para el caso de la cromatografía por afinidad, se aplicó un 40% de la solución B y posteriormente el 100% de B durante 20 minutos.

Gracias al cromatograma generado, es posible conocer en qué fracciones se encuentra la enzima. Esta es entonces concentrada hasta 1 ml utilizando una membrana de ultrafiltración de 30 kDa, centrifugando a 6000 rpm y 4°C. Se realiza

el cambio a buffer de trabajo (buffer de acetatos 50 mM pH 6 y 1mM de CaCl_2) en una membrana de ultrafiltración, adicionando 1 volumen de filtro de este buffer y concentrando de nuevo a 1 mL. Este procedimiento se realizó un total de 2 veces.

6.2.1.2 PURIFICACIÓN DE ENZIMAS POR CUERPOS DE INCLUSIÓN

Para la purificación de cuerpos de inclusión a partir de la versión truncada IslA5, se partió de un pellet previamente lisado y almacenado a -80°C . El procedimiento de purificación se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante del kit de purificación BugBuster™ Protein Extraction Reagent.



Figura 6:1 Esquema del proceso de purificación de cuerpos de inclusión

6.2.2 REPLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS

Una vez obtenidos los cuerpos de inclusión puros, estos son resolubilizados en un volumen de 5 ml (para un pellet obtenido a partir de un litro de fermentación) de cloruro de guanidinio (GnHCl) 6 M pH 6.5 mantenida a 4°C . Para lograr el replegamiento de la proteína se utilizó el método de dilución por goteo. Las muestras se diluyeron 100 veces en buffer de acetatos 0.05 M pH 6.0, adicionado con arginina 0.2 M y CaCl_2 1 mM con agitación suave, a 4°C . Posteriormente, la muestra se

concentró a un volumen final de 5 mL con cambio de buffer de trabajo (buffer de acetatos 0.05 M, CaCl₂ 1 mM, pH 6.0).

6.2.3 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

La cuantificación de proteína total se realizó mediante el método de Bradford utilizando el reactivo Protein Assay (Bio-Rad), teniendo como estándar seroalbúmina bovina (BSA, Bio-Rad) [42].

6.2.4 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

Las enzimas purificadas fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes. Se utilizó una cámara de electroforesis Mighty small II y geles de 1 mm de espesor. Un gel concentrador al 4% precede al gel separador al 10%. La proteína se mezcló con amortiguador de carga 2X que contiene 0.125 M Tris-HCl pH 6.8, SDS 4% (w/v), glicerol 10% (v/v) y azul de bromofenol 0.05% (w/v). El gel se cargó con 25 µg de proteína y la electroforesis se corrió a 20 mA durante aproximadamente 1 h. Los geles fueron teñidos con solución de azul de Coomassie 0.125% y desteñidos en agua durante una noche para remover el exceso de colorante.

6.2.5 ZIMOGRAMA

Para observar la actividad enzimática a través de los productos se realizó un zimograma. Dicha técnica utiliza como agente revelador reactivo de Schiff, el cual detecta grupos aldehído, fácilmente observados por la aparición de bandas rosadas. Se corrió un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, que es posteriormente lavado por triplicado con 30 mL de tween 80 al 1%. A continuación, se incubó de 12-16 h en sacarosa 100 g/L (previamente preparada en el buffer de trabajo). Pasado el tiempo de incubación el gel se lavó por 30 min con una solución

de etanol al 75% y durante una hora con una solución de ácido peryódico al 0.7% y ácido acético al 5%. Finalmente, se realizaron 3 lavados de 20 min c/u con una solución de metasulfito de sodio al 0.2% y ácido acético al 5%. A continuación, se tiñó con reactivo de Schiff por 20 min. El exceso de colorante fue retirado con una solución de metabisulfito de sodio al 0.5% y ácido acético al 5%. La técnica se basa en la oxidación de dioles vecinales presentes en los anillos de las fructosas que conforman el polímero, lo que resulta en la producción de compuestos con grupos carbonilos expuestos (aldehídos en este caso) [43]. Posteriormente, los grupos amino del reactivo de Schiff reaccionan con los grupos aldehído para formar grupos aldimina, mejor conocidos como bases de Schiff, dando lugar a la coloración magenta [44].

6.3 CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA

6.3.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA FRUCTOSILTRANSFERASA

Los ensayos de actividad inulosacarasa de las versiones truncadas se llevaron a cabo midiendo la velocidad inicial de liberación de poder reductor mediante la técnica de DNS ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, NaOH y ácido 3,5-dinitrosalicílico), a partir de una solución de sacarosa de 100 g/L (292 mM) y 400 g/L (1170 mM) utilizando buffer de trabajo (buffer de acetatos 50 mM pH 6.0) a la temperatura seleccionada (30°C o 20°C). Se tomaron alícuotas de 50 μL del medio de reacción cada determinado tiempo, se les añadió 50 μL de DNS y se calentaron a ebullición durante 5 minutos. Después de enfriar las muestras en hielo por 5 min se midió la absorbancia a 540 nm.

6.3.2 ENSAYO DE ESTABILIDAD ENZIMÁTICA

Se determinó la estabilidad enzimática a 35°C de la versión truncada ISIA5 soluble. Para la determinación, se incubó 1 U/mL de enzima a 35°C. Se tomaron alícuotas

cada 30 min durante 3.5 h y se determinó la actividad residual a 30°C mediante la técnica de azúcares reductores (DNS). Con estos datos se determinó el tiempo de vida media de la enzima soluble ($t_{1/2}$) y la constante de desactivación de primer orden (k). A partir del cálculo de la constante de desactivación se estimó el tiempo de vida media:

$$(1) \ln Act = -kt,$$

de donde se puede demostrar que:

$$(2) \ln \frac{A}{A_0} = -kt,$$

siendo A_0 la actividad inicial y A actividad a tiempo "t". Por lo tanto, el tiempo de vida media se calcula:

$$(3) t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

6.3.3 ENSAYO DE TEMPERATURA ÓPTIMA DE ISLA5

Para determinar la temperatura óptima de la versión truncada ISLA5, se llevaron a cabo ensayos enzimáticos incubando 1 U/mL de enzima en un intervalo de temperatura de 10 a 35°C, y evaluando la actividad enzimática residual cada 5°C. La temperatura óptima de la enzima fue expresada como el porcentaje de actividad específica a diferentes temperaturas, siendo el 100% la actividad específica mayor. El ensayo se realizó con un lote nuevo de enzima, por triplicado, en buffer de acetatos 50 mM, CaCl₂, pH 6.0.

6.3.4 ENSAYO DE PH ÓPTIMO DE ISLA5

Para la determinación del pH óptimo de ISLA5 se llevaron a cabo ensayos enzimáticos en buffer de acetatos a pH 5, 6 y 7. Se utilizó 1 U/mL de enzima de un lote diferente para cada determinación. La extracción de enzima a partir de un botón (pellet) proveniente de 1 L de fermentación, se realizó al pH de la determinación. El

pH óptimo fue expresado como el porcentaje de actividad específica a diferentes temperaturas, siendo el 100% la actividad específica mayor. El ensayo se realizó con un lote nuevo de enzima, por triplicado, a 30°C.

6.4 DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE PRODUCTOS

6.4.1 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE SACAROSA

Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo empleando 1 U/mL de la versión troncada correspondiente en presencia de 100 g/L o 400g/L de sacarosa como sustrato. Las reacciones se mantuvieron en agitación a 300 rpm y a 30°C. La mezcla de reacción se realizó en un volumen de 600 µL con buffer de trabajo. Las reacciones fueron monitoreadas a distintos tiempos retirando alícuotas de 20 µL del medio de reacción que fueron congeladas inmediatamente en una mezcla de hielo seco/acetona y posteriormente calentadas en agua hirviendo durante 10 min para la inactivación de la enzima. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su análisis.

6.4.2 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES SIMPLES

La cuantificación de azúcares simples (fructosa, glucosa, sacarosa) se realizó mediante cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) en un sistema Waters (Waters Corp.) que incluye un cargador de muestras automático Waters 717, una bomba binaria Waters 2414 y un detector de índice de refracción Waters 2414. La cromatografía se desarrolló en una columna Prevail Carbohydrate ES (4.6 x 250 mm, GRACE) mantenida a 30°C y empleando acetonitrilo/agua (75:25) como fase móvil a un flujo de 1 mL/min. La relación hidrólisis/transferencia (H/T) se obtuvo a partir de los valores de fructosa (F) y glucosa (G) libres obtenidos de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$\% H = \frac{F}{G} \quad \% T \equiv \frac{(G-F)}{G}$$

6.4.3 DETERMINACIÓN DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)

La determinación inicial de fructooligosacáridos se llevó a cabo por cromatografía en capa fina (TLC) empleando placas de sílica gel ALUGRAM Xtra SIL G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel). La cromatografía se desarrolló en una cámara horizontal usando como fase móvil una mezcla de butanol-etanol-agua (10:6:4 v/v/v). El revelado de placas se realizó por aspersion con difenilamina-anilina y calentamiento (220°C). La identificación de productos se realizó a partir de estándares de FOS tipo levana e inulina producidos en el laboratorio.

6.4.4 DETERMINACIÓN DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS POR HPAEC-PAD

La detección de fructooligosacáridos se desarrolló mediante cromatografía de intercambio aniónico de alto desempeño con detección amperométrica de campos pulsados (HPAE-PAD, por sus siglas en inglés), en un equipo Dionex equipado con un detector de pulso amperométrico (ED50 Dionex) y una columna CarboPac PA-200 (3 x 250 mm). La columna fue equilibrada a 30°C con 150 mM de NaOH a un flujo de 0.5 mL/min y las fructanas fueron eluidas con un gradiente de acetato de sodio (5-100 mM de acetato de sodio por 25 minutos, 100-400 mM de acetato de sodio por 60 min y 10 min de re-equilibrio en condiciones iniciales). Se emplearon como estándares glucosa, fructosa, sacarosa, 1-kestosa, 6-kestosa, neokestosa, nistosa y fructofuranosil-nistosa.

6.4.5 DETERMINACIÓN DE POLÍMERO

La distribución del peso molecular de los productos sintetizados fue analizada por cromatografía de permeación en gel (GPC) en un sistema UltiMate 3000 RS (DIONEX) empleando dos columnas Ultrahydrogel SEC (Waters) en serie,

Ultrahydrogel Linear (7.8 x 300 mm) y Ultrahydrogel 500 (7.8 x 300 mm) con un índice de exclusión entre 0.50 y 10,000 kDa, acopladas a un detector de índice de refracción Shodex RI-101(Showa Denko). La cromatografía se desarrolló mediante una elución isocrática con nitrato de sodio 0.1 M como fase móvil a un flujo de 0.8 mL/min y 30°C.

7. RESULTADOS

7.1 ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA REGIÓN N₁₀₀ TERMINAL EN EL MECANISMO DE ELONGACIÓN

Con el fin de profundizar en el papel de la región N₁₀₀ terminal sobre la producción de polímero, se seleccionaron las versiones truncadas IsIA4 e IsIA5. La enzima IsIA4 es una versión truncada de la inulosacarasa IsIA de 64 kDa, conformada por el dominio catalítico y la región N₁₀₀ terminal, objeto de estudio (Figura 7:1). Debido a estas características, fue seleccionada para estudiar la influencia de la región mencionada en el mecanismo de elongación de la enzima. Esta enzima es capaz de producir un polímero de alto peso molecular de tipo inulina y presenta una relación de hidrólisis / transferencia de 70/30 [22].

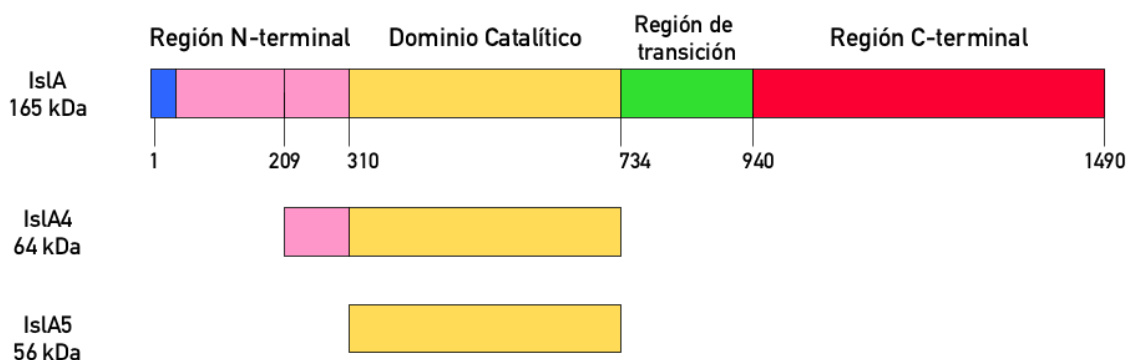


Figura 7:1. Versiones truncadas seleccionadas para el estudio de la región N₁₀₀ terminal

Por otra parte, se llevó a cabo el estudio de IsIA5, enzima que carece de la región N₁₀₀ terminal, así como de los dominios adicionales presentes en IsIA, simulando a una inulosacarasa unidominio [45]. Los resultados obtenidos a partir de la comparación de ambas enzimas se usaron para esclarecer el papel de la región N₁₀₀ terminal sobre la actividad enzimática y el tipo de producto sintetizado.

7.2 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE ISIA5

7.2.1 DETERMINACIÓN DE TEMPERATURA Y PH ÓPTIMOS

Con el objetivo de conocer las condiciones óptimas de reacción de IsIA5, se realizaron ensayos para determinar el pH y la temperatura óptimos para la enzima. Para realizar el ensayo de pH óptimo, se analizó un rango de pH de 5 a 7, a 30°C, mientras que, para el ensayo de temperatura óptima, se determinó la actividad específica en un intervalo de temperaturas de 10°C a 35°C. Como se muestra en la Figura 7:2, el ensayo de pH óptimo mostró que la enzima trabaja de forma adecuada a pH 6.0, mientras que a pH 5.0 la actividad enzimática disminuye apenas un 7%, y a pH 7.0 la actividad enzimática desciende hasta un 78%.

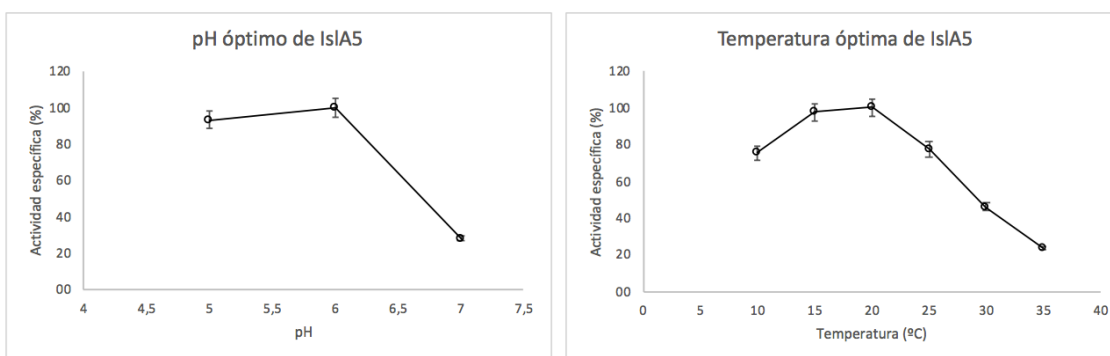


Figura 7:2 Determinación de pH y temperatura óptimos de IsIA5. Los ensayos se llevaron a cabo con 1170 mM de sustrato.

De acuerdo con reportes anteriores [22], [41], todas las versiones truncadas de IsIA presentan un porcentaje de actividad mayor al 90% a pH de 6.0, sin embargo es pH 6.5 que alcanzan su máxima actividad, lo que sugiere que IsIA5 podría comportarse de forma similar. Por otra parte, muchas de las IS reportadas tienen una actividad enzimática máxima a valores de pH que oscilan entre 4.5 y 7.0 [29], [31], [32] y todas coinciden en una importante disminución de la actividad enzimática a valores de pH mayores a 7.0.

En cuanto al ensayo de temperatura óptima, se encontró que la mayor actividad enzimática se obtiene a 20°C, mientras que a 15°C la actividad es del 98% y a 30°C la actividad enzimática se abate un 54% (Figura 7:2).

Estos ensayos permitieron establecer que las condiciones óptimas de reacción para IsIA5 respecto a pH son las mismas que para el resto de las versiones truncadas de IsIA y para la enzima silvestre, y se encuentra dentro del intervalo de pH al cual trabajan otras inulosacararas (Tabla 1:2), lo que sugiere que la remoción de la región N₁₀₀ terminal no influye en esta característica. Por otra parte, se observó un cambio significativo en la temperatura óptima de IsIA5, ya que presenta el valor más bajo de las versiones truncadas de IsIA, así como del resto de las inulosacararas conocidas.

Una vez determinados los valores de temperatura y pH óptimos, se determinó la actividad enzimática de IsIA5. A 20°C IsIA5 exhibe una actividad específica de 40 U/mg y se recuperan hasta 26 U por litro de fermentación. La comparación de la actividad enzimática de IsIA5 con IsIA4 permite concluir que su actividad enzimática es un 54% menor en comparación con IsIA4.

La actividad enzimática del resto de las versiones truncadas no puede ser comparada debido a diferencias en la determinación de la actividad [4], no obstante, se observa la tendencia que al eliminar dominios adicionales, la actividad específica aumenta, alcanzando un valor máximo con IsIA4, y posteriormente disminuyendo al eliminar la región N₁₀₀ terminal, en IsIA5.

7.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS VERSIONES TRUNCADAS A 20°C

Para determinar la influencia de la región N₁₀₀ terminal en el mecanismo de elongación y especificidad de producto, se realizó la caracterización de las versiones truncadas IslA4 e IslA5 en condiciones óptimas de temperatura para IslA5, es decir, 1 U, 20°C, pH 6.0 y 292 mM de sustrato. Para ambas enzimas se determinó la actividad enzimática, mediante la técnica de azúcares reductores con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) y la cantidad de sacarosa consumida en un tiempo determinado, o porcentaje de conversión de sacarosa. Así mismo, para determinar el porcentaje del sustrato que es transferido a los productos sintetizados y aquel que es hidrolizado, pero que no forma parte de los productos finales, se determinó la relación hidrólisis / transferencia (H/T) mediante las técnicas de cromatografía en capa fina (TLC) y por cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección de pulso amperométrico (HPAEC-PAD). Finalmente, para conocer la cantidad de polímero sintetizado por la enzima, se llevó a cabo su cuantificación utilizando la técnica de cromatografía de permeación en gel (GPC).

7.3.1 CARACTERIZACIÓN DE LA REACCIÓN LLEVADA A CABO POR ISLA4 A 20°C

7.3.1.1 ANALISIS DE LA REACCIÓN Y RELACION HIDRÓLISIS / TRANSFERENCIA DE ISLA4 A 20°C

Se ha reportado que la temperatura influye en la tasa de reacción de hidrólisis / transferencia en las inulosacarasas de *L. gasseri* y *L. reuteri* 121, donde se ha observado que a bajas temperaturas se favorece la actividad transglicosilasa, mientras que a altas temperaturas se favorece la hidrólisis [3], [29], [31], [32], [46]. Sin embargo, no se cuenta con información sobre la influencia de ésta en el mecanismo de elongación. Por esta razón y para realizar una comparación con IslA5, se realizaron estudios para determinar si la temperatura influye en la tasa de reacción de hidrólisis / transferencia y en la especificidad de producto de IslA4.

La determinación de la actividad enzimática se llevó a cabo a pH 6.0, 292 mM de sacarosa y 20°C. La enzima IsIA4 presentó una actividad específica de 14 U/mg a 20°C, que representa apenas el 16% de la actividad enzimática de IsIA4 a 30°C, reportada en 97.85 U/mg [47]. Dicho de otra forma, reducir la temperatura de reacción en 10°C provoca la disminución de la actividad enzimática de IsIA4 hasta en un 84%.

Para determinar el comportamiento de la reacción de IsIA4 a 20°C, se analizaron las muestras de reacciones llevadas a cabo utilizando 1 U/mL de enzima, pH 6.0 y 292 mM de sacarosa, en un volumen final de 600 μ L. En la Figura 7:3A se muestran los productos de la reacción llevada cabo por IsIA4 y monitoreada por TLC durante 48 h. Con esta técnica fue posible observar la producción de polímero (presente en el punto de aplicación, al fondo de la placa) y el avance cualitativo de la reacción (Figura 7:3A).

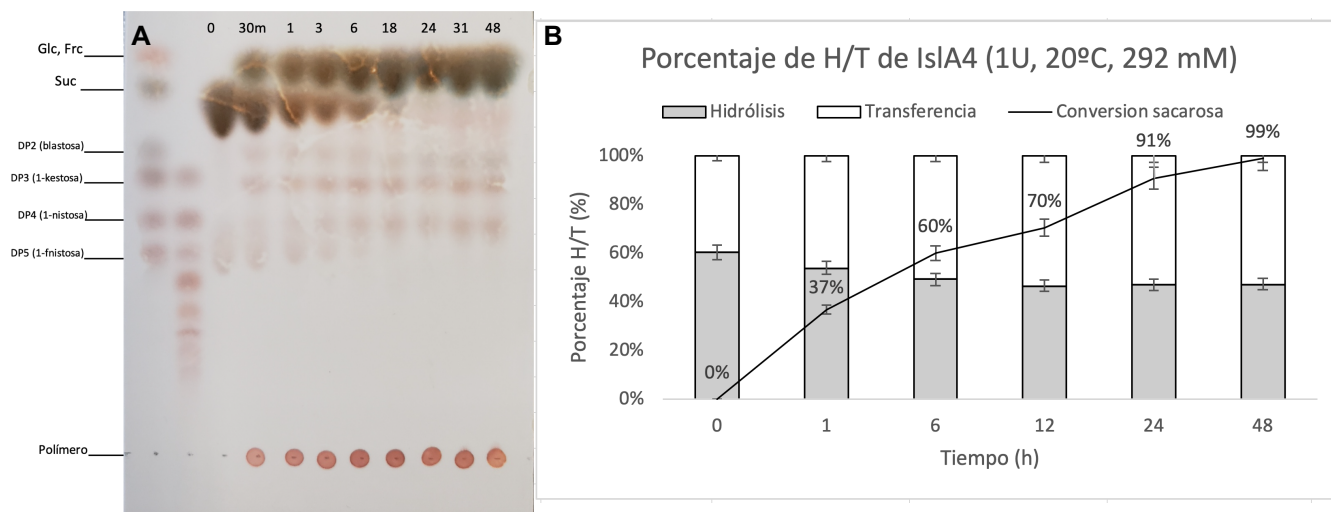


Figura 7:3 **A**) Ensayo de cromatografía en capa fina (TLC) del perfil de productos de IsIA4 1 U, 20°C y 292 mM de sacarosa. Estándares: Glc = glucosa, Frc = Fructosa, Suc: sacarosa, B: blastosa, 1-K: 1-kestosa, 1-N: 1-nistosa, 1-FN: 1-fructofuranosil nistosa. **B**) Relación H/T y consumo de sacarosa de IsIA4 a 20°C, a 48 h de reacción

Adicionalmente, la TLC sugiere la presencia de diversos FOS con un DP de 5 que se forman desde los primeros tiempos de reacción y que desaparecen al final de ésta (18 a 48 h). El ensayo para determinar el consumo de sacarosa mostró que a las 24 h la enzima llega al 90% de conversión, con una tasa de hidrólisis / transferencia de 47/53, si bien es interesante notar que durante los primeros segundos de la reacción (10 s) el porcentaje H/T es 60/40, y a medida que esta avanza, la relación se estabiliza a 47/53 a partir de las 12 h, manteniéndose constante hacia el final de la reacción (Figura 7:3B).

La comparación de este valor de H/T con el reportado a 30°C indica que la actividad hidrolítica de la enzima disminuye a bajas temperaturas (20°C), probablemente debido a que a una menor temperatura la enzima pierde actividad o probablemente tiene una mayor afinidad por su sustrato, como fue reportado previamente para la inulosacarasa de *L. reuteri* 121 [29].

7.3.1.2 PERFIL DE PRODUCTOS DE ISLA4 A 20°C

Por otra parte, el análisis del perfil de FOS por HPAEC-PAD permitió identificar diversos fructooligosacáridos entre los cuales se observa la presencia de 1-kestosa, blastosa, inulobiosa (F2-I), 6-kestosa, ercosa, 1,6-nistosa y levanotriosa (F3-L), además de algunas productos (*) que no pudieron ser indentificadas con los estándares utilizados (Figura 7:4).

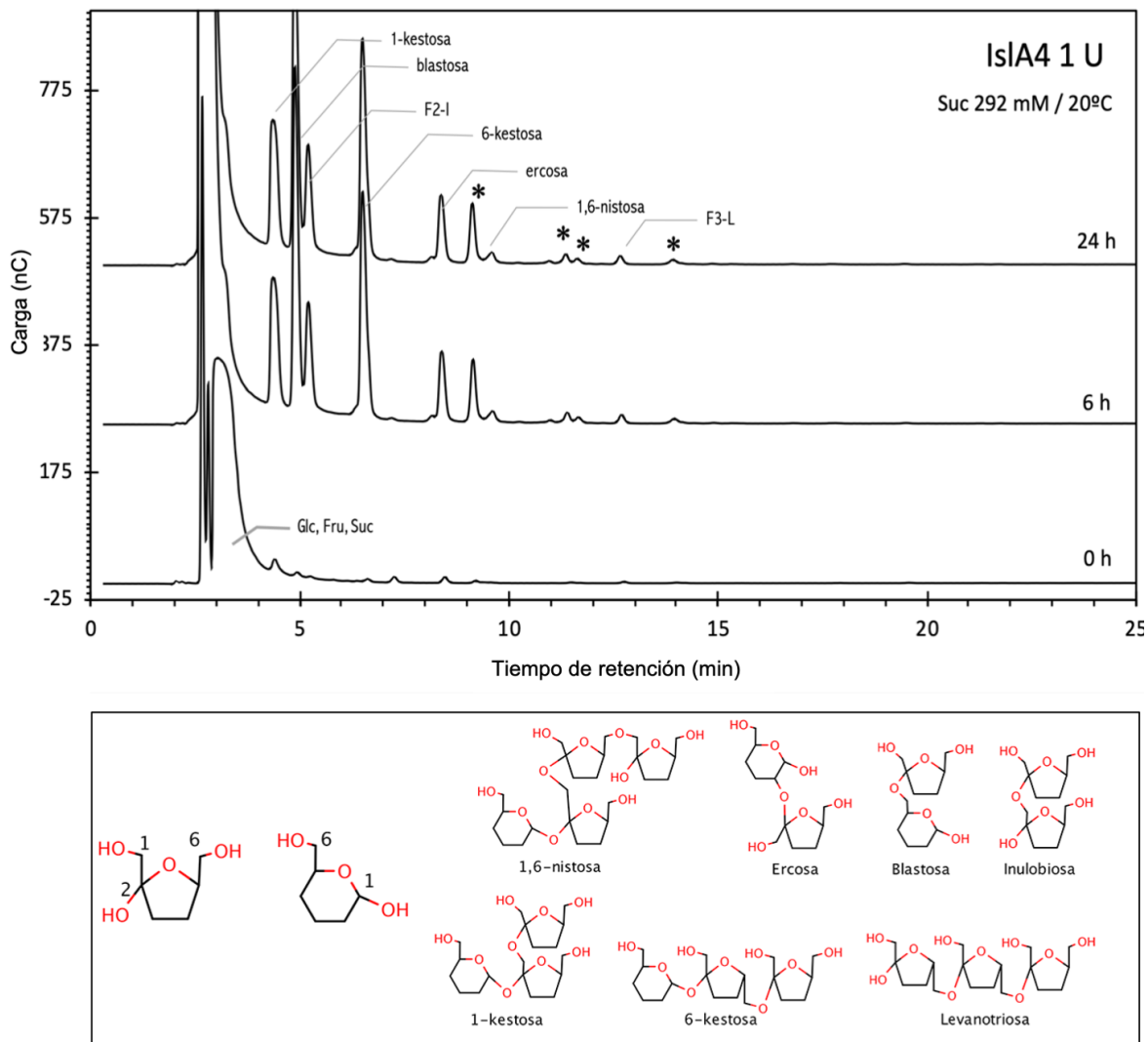


Figura 7:4 Perfil de productos de IsIA4 a 1 U/mL, 20°C y 292 mM de sacarosa. Se muestran las estructuras de los productos sintetizados y la posición de los enlaces. Señal no identificada con los estándares utilizados (*).

Finalmente, se llevó a cabo la cuantificación de polímero de alto peso molecular (pAPM). Como se observa en la Figura 7:5 la enzima es capaz de producir pAMP, (observado a un tiempo de retención a proxímadamente 15 min) a diferencia de los productos reportados a 30°C [47], donde se observó la acumulación de productos de bajo peso molecular (a un tiempo de retención de 25 min). Esta observación resulta interesante porque sugiere que un cambio en la temperatura de reacción

provoca un cambio en el tamaño de los productos de bajo peso molecular que esta enzima puede sintetizar.

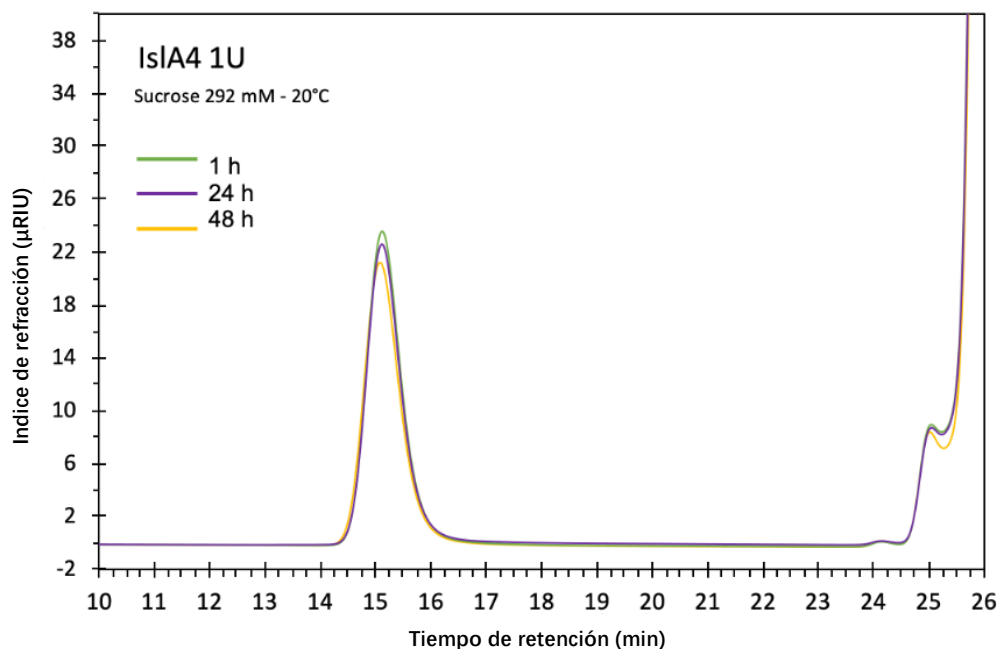


Figura 7:5 Cuantificación de polímero de alto peso molecular de IsIA4 a 292 mM de sustrato.

Respecto a la concentración de polímero, y tomando en cuenta un porcentaje de conversión del 90%, IsIA4 a 20°C produce 17.2g/L de polímero de alto peso molecular, equivalente a un 19% del sustrato dirigido a la reacción de transferencia, mientras que la síntesis de productos de bajo peso molecular representa un 34%. El porcentaje de productos de bajo peso molecular se calcula con base en el porcentaje de conversión de sacarosa a la que se realiza la cuantificación del polímero y el porcentaje de transferencia. De este porcentaje de transferencia se conoce la cantidad de sustrato dirigido a polímero de alto peso molecular, y por diferencia se obtiene el porcentaje de productos de bajo peso molecular (ver Anexos para un ejemplo de cálculo).

Así mismo, se observa una ligera disminución en la concentración del polímero de alto peso molecular conforme la reacción de síntesis va avanzando, sin embargo,

dicha variación responde a la desviación estándar de la cuantificación, concluyendo que la concentración de polímero permanece constante a lo largo de la reacción.

Tabla 7:1 Concentración de polímero de alto peso molecular a 292 mM, producido por IsIA4 a 1 U y 20°C

Tiempo (h)	Concentración (g/L) con 292 mM de sacarosa
1	18.2 ± 1.6
24	17.2 ± 1.6
48	15.7 ± 2.4

7.3.2 CARACTERIZACIÓN DE LA REACCIÓN LLEVADA A CABO POR ISLA5 A 20°C

7.3.2.1 ANALISIS DE LA REACCIÓN Y RELACION HIDRÓLISIS / TRANSFERENCIA DE ISLA5 A 20°C

Continuando con la comparación de las versiones truncadas, se determinó el perfil de productos de IsIA5 a 20°C. La Figura 7:6 muestra la reacción llevada a cabo con 1 U/mL de enzima, buffer de acetatos 50 mM y CaCl₂ 1 mM a pH 6.0, durante 112 h. Como se muestra en la Figura 7:6A, hay aparición de FOS con un DP de hasta 4 y presencia de polímero. La presencia de sacarosa después de 112 h de reacción sugiere que la enzima no es capaz de consumir el sustrato en su totalidad, probablemente debido a la inactivación de esta, o bien, debido a que presenta inhibición por sustrato. Esta última hipótesis podría ser corroborada mediante la determinación de las constantes cinéticas de inhibición.

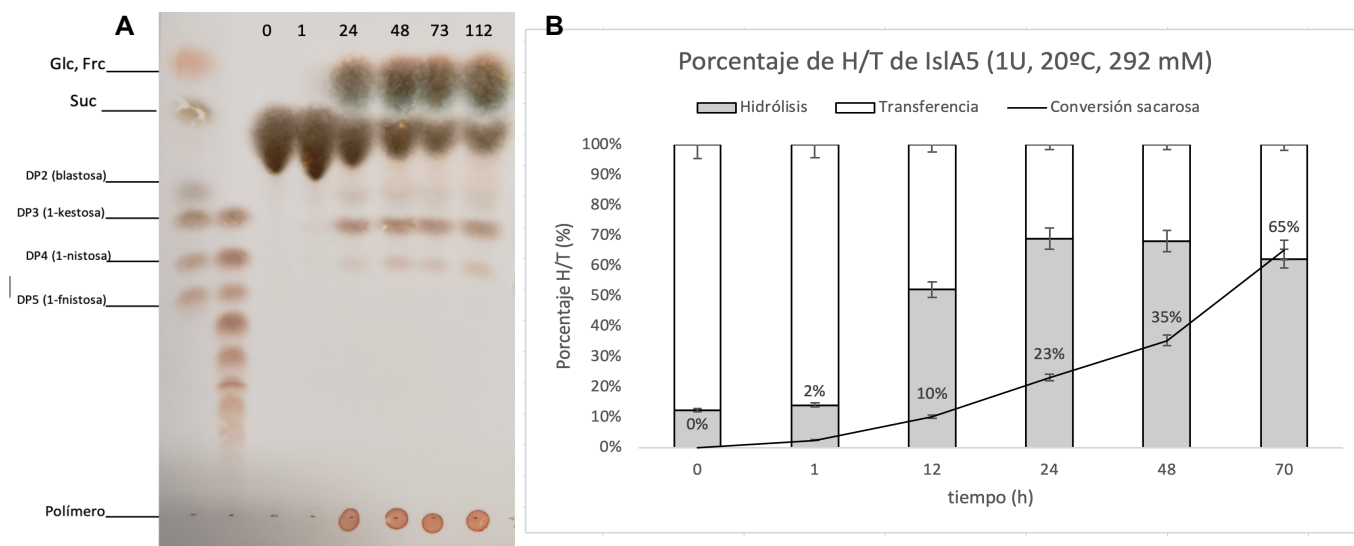


Figura 7:6 **A)** Ensayo de cromatografía en capa fina (TLC) del perfil de productos de ISLA5 con sacarosa 292 mM. Estándares: Glc = glucosa, Frc = Fructosa, Suc: sacarosa, B: blastosa, 1-K: 1-kestosa, 1-N: 1-nistosa, 1-FN: 1-fructofuranosil nistosa. **B)** Relación H/T y consumo de sacarosa de ISLA5 a 20°C, a 70 h de reacción

Adicionalmente, la determinación de la conversión de sacarosa mostró que a las 24 h la enzima sólo ha consumido el 23% del sustrato, y pasadas 70 h de reacción sólo alcanza el 65% de conversión (Figura 7:6B). Más interesante aún es el hecho de que la enzima es predominantemente transferasa durante los primeros segundos de la reacción, y a medida que ésta avanza, la relación H/T se modifica, hasta alcanzar un porcentaje de 63/38 tras 70 h de reacción, indicando que la actividad hidrolítica predomina.

7.3.2.2 PERFIL DE PRODUCTOS DE ISLA5 A 20°C

El análisis del perfil de productos por HPAEC-PAD permitió identificar la presencia de diversos FOS entre los que se encuentran la 1-kestosa, blastosa, inulobiosa (F2-1), 6-kestosa, neo-kestosa, ercosa, nistosa, 1,6-nistosa, inulotriosa. (F3-I), 6,6-nistosa y 1,2-nistosa (GF4-I), además de un producto (*) que no pudo ser identificado con los estándares con los que se cuentan actualmente (Figura 7:7).

La cuantificación de polímero demostró la presencia sólo de polímero de alto peso molecular, sin presencia de polímero de bajo peso molecular (Figura 7:8). Así mismo, se observó que, con el paso del tiempo, la cantidad de polímero aumentó, llegando a producir hasta 12.2 g/L después de 70 h de reacción y 65% de conversión de sacarosa. Estos resultados sugieren que IsIA5 presenta un mecanismo de elongación procesivo, pues produce FOS con un $GP < 10$ y polímero de alto peso molecular de forma preferencial. La capacidad de producir polímero de alto peso molecular de la enzima IsIA5 carente de la región N₁₀₀ terminal indica que esta región no es indispensable en el mecanismo de elongación de la inulosacarasa como fue observado con la levansacarasa LevS.

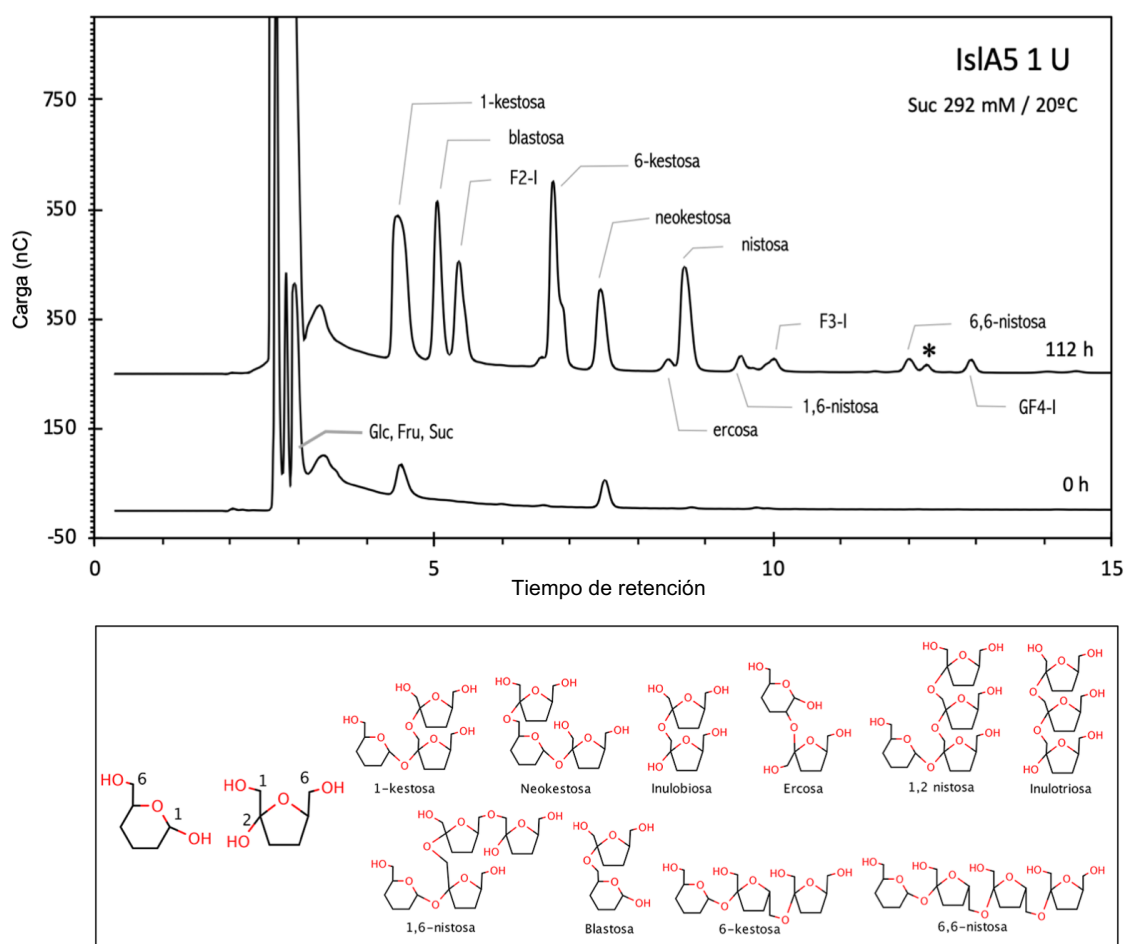


Figura 7:7 Perfil de productos de IsIA5 a 1 U/mL, 20°C y 292 mM. Se muestran las estructuras de los productos sintetizados. Señal no identificada con los estándares utilizados (*).

Así mismo, los datos de la concentración de polímero y el retardo en el consumo de sustrato sugieren que la región N₁₀₀ terminal participa mejorando la actividad de la enzima, específicamente en la producción de polímero, ya que IsIA5 sólo es capaz de producir 9.6 g/L de polímero a un porcentaje de conversión de sacarosa del 35%, mientras que IsIA4 produce el doble de polímero (18.2g/L) al mismo porcentaje de conversión (Tabla 7:2).

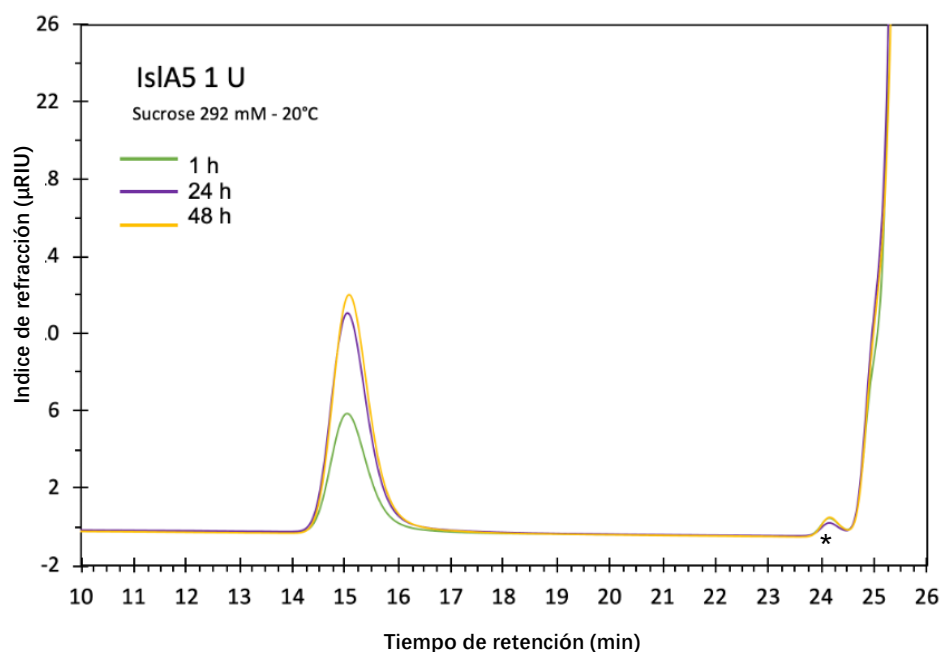


Figura 7:8 Cuantificación de polímero de alto peso molecular de IsIA5 a 292 mM de sustrato. * Esta señal no representa algún producto sintetizado por la enzima.

Adicionalmente, no se observa disminución en la concentración de polímero sintetizado por IsIA5 a lo largo del tiempo, probalmente debido a que no se consumió completamente el sustrato después de 70 h de reacción (65% de conversión de sacarosa).

Tabla 7:2 Concentración de polímero de alto peso molecular a 292 mM de sustrato, producido por IslA5 a 1 U y 20°C

Tiempo (h)	Concentración (g/L) con 292 mM de sacarosa
1	6.5 ± 0.14
24	8.8 ± 0.42
48	9.6 ± 0.60

7.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS VERSIONES TRUNCADAS EN CONDICIONES ESTÁNDAR DE REACCIÓN

7.4.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS VERSIONES TRUNCADAS EN CONDICIONES ESTÁNDAR

Además de la caracterización de las versiones truncadas IsIA4 e IsIA5 a 20°C, se determinó la actividad específica de ambas enzimas en condiciones estándar (o de máxima actividad enzimática), es decir, 1 U de enzima, 30°C, 292 mM de sacarosa y pH 6.0. Se encontró que IsIA4 exhibe una actividad específica de 87.1U/mg (Tabla 7:3), mientras que el valor reportado por Peña-Cardena (2013) es de 97.85 U/mg [49].

Por otra parte, se reporta una actividad enzimática de 0.383 U/mg para IsIA5. Este valor representa un 0.44% de la actividad enzimática de IsIA4, lo que demuestra que IsIA5 es muy poco activa a las condiciones estándar de trabajo establecidas en nuestro laboratorio. Los datos se resumen en la Tabla 7:3.

Tabla 7:3. Actividad específica y porcentaje de hidrólisis / transferencia de IsIA4 e IsIA5 en condiciones estándar de reacción (30°C y 292mM de sustrato).

Enzima	Actividad específica (U/mg)
IsIA4	87.1 ± 7.2
IsIA5	0.383 ± 0.052

Así mismo, dado el valor de actividad tan bajo reportado para IsIA5, no fue posible llevar a cabo el estudio del perfil de productos ni la determinación de la relación H/T de dicha enzima sin embargo, se realizó el estudio de IsIA4 a 30°C para llevar a cabo la comparación de IsIA4 e IsIA5 a las condiciones de máxima actividad para cada enzima.

7.4.2 CARACTERIZACIÓN DE LA REACCIÓN LLEVADA A CABO POR ISLA4 EN CONDICIONES ÓPTIMAS

7.4.2.1 ANALISIS DE LA REACCIÓN Y RELACION HIDRÓLISIS / TRANSFERENCIA DE ISLA4 A 30°C

El análisis de la reacción de Isla4 se realizó en las condiciones de máxima actividad previamente reportadas para su evaluación, es decir, 1U/mL 30°C, pH 6.0 y 292 mM de sustrato [47], mediante las técnicas de cromatografía en capa fina (TLC) y por cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección de pulso amperométrico (HPAEC-PAD).

La Figura 7:9A muestra una placa de TLC que sugiere que desde los primeros tiempos de reacción hay formación de polímero de alto peso molecular (5 minutos), así como la formación de FOS con un DP de hasta 3 desde los primeros 30 minutos de reacción, así como FOS con un DP de 4 hacia tiempos finales. Por otra parte, en la Figura 7:9B se observa que, a 24 h de reacción, el sustrato se ha consumido un 90%, mientras que a las 36 h de reacción el consumo de sacarosa alcanza el 93%.

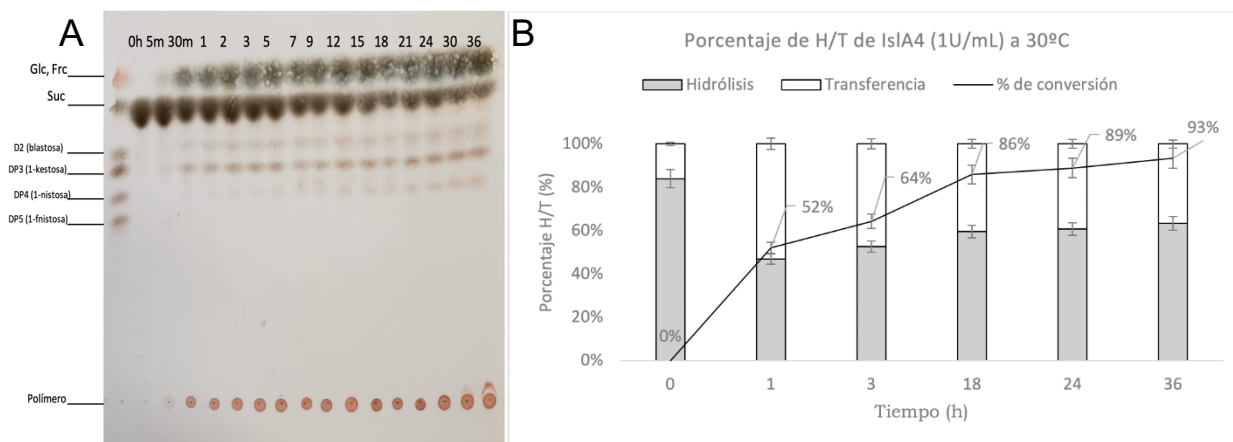


Figura 7:9 **A)** Ensayo de cromatografía en capa fina (TLC) del perfil de productos de Isla4 a 30°C y sacarosa 292 mM. Estándares: Glc = glucosa, Frc = Fructosa, Suc: sacarosa, B: blastosa, 1-K: 1-kestosa, 1-N: 1-nistosa, 1-FN: 1-fructofuranosil nistosa. **B)** Determinación del porcentaje de conversión de sacarosa y porcentaje de hidrólisis/ transferencia de Isla4.

Estos datos indican que a los primeros tiempos de reacción la enzima es principalmente hidrolítica. Sin embargo, se observa que a medida que avanza la reacción, dicho perfil se modifica hasta alcanzar una relación H/T de 61/39, así como un porcentaje de conversión de sacarosa cercano al 90%. Los datos de IsIA4 obtenidos a 20°C a un porcentaje de conversión similar muestran que la enzima es un 26% más transferasa a bajas temperaturas, comportándose de forma similar a las inulosacarinas de *L. gasseri* y *L. reuteri* 121 [3], [29], [31]. Por otra parte, la comparación de IsIA4 con IsIA5 a las condiciones óptimas de cada enzima y un 65% de conversión de sacarosa, muestra que IsIA5 es apenas un 17% más hidrolítica que IsIA4.

7.4.2.2 PERFIL DE PRODUCTOS DE ISIA4 A 30°C

El perfil de FOS de IsIA4 que se obtuvo en condiciones estándar revela la presencia de pocos productos de bajo peso molecular entre los que se encuentran la 1-kestosa, blastosa, inulobiosa (F2-I), 6-kestosa, neokestosa, nistosa, levanobiosa, 1,2-nistosa (GF4-I) e inulotetraosa (F4-I), así como una señal que no pudo identificarse con los estándares utilizados (*) (Figura 7:10).

A 20°C IsIA4 no es capaz de producir levanobiosa, neokestosa, 1,2 nistosa (GF4-I) ni inulotetraosa (F4-I), productos presentes en el perfil de productos de IsIA4 a 30°C, pero en cambio produce ercosa y levanotriosa (F3-L). Esto sugiere que a 20°C la enzima probablemente no es capaz de producir y/o acumular FOS con un DP de 4 (como la 1,2-nistosa y la inulotetraosa), pero en cambio es capaz de producir y/o acumular levanotriosa, lo que indica que es capaz de elongar FOS con enlace β -2,6 hasta un DP de 3.

Adicionalmente, la comparación del perfil de productos de ambas versiones truncadas en condiciones de máxima actividad enzimática muestra que IsIA5 es

capaz de producir y/o acumular FOS con un DP de 4 al igual que IsIA4, pero además sintetiza FOS con enlace β -2,6 con un DP de hasta 4 (6,6-nistosa).

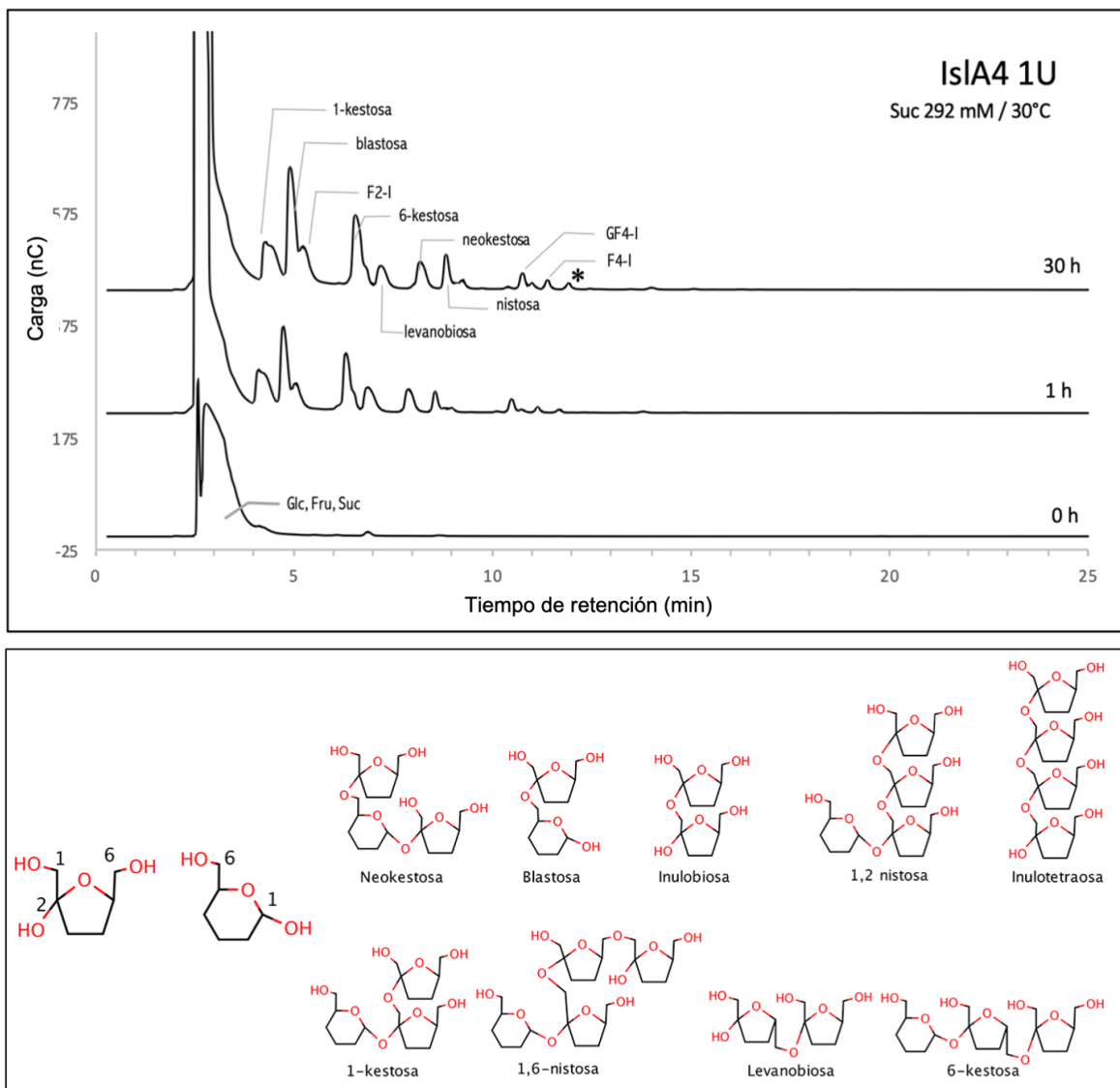


Figura 7:10 Perfil de productos de IsIA4 a 1 U/mL, 30°C y 292 mM de sustrato. Se muestran las estructuras de los productos sintetizados y la posición de los enlaces. Señal no identificada con los estándares utilizados (*).

Comparando el perfil de productos obtenidos en este trabajo con aquel de IsIA4 reportado con anterioridad [49], se aprecian ligeras diferencias. Mientras que Peña-Cardeña reporta la producción de 6-kestosa, nistosa, fructofuranosil nistosa y

blastosa, en este trabajo se identificaron, además, otros FOS tales como inulobiosa, neokestosa o levanobiosa. Esta diferencia puede deberse a que cuando fue reportado el perfil de FOS de esta enzima, no se contaban con estándares para la identificación de FOS con un $DP > 3$.

Finalmente, se realizó la cuantificación del polímero de alto peso molecular (pAPM) sintetizado por IsIA4 a condiciones estándar de reacción. El cromatograma de la Figura 7:11 muestra predominantemente la presencia de pAPM, y a penas una pequeña cantidad de productos de bajo peso molecular. Este último dato concuerda con lo observado en el análisis de FOS por HPAEC-PAD (Figura 7:10).

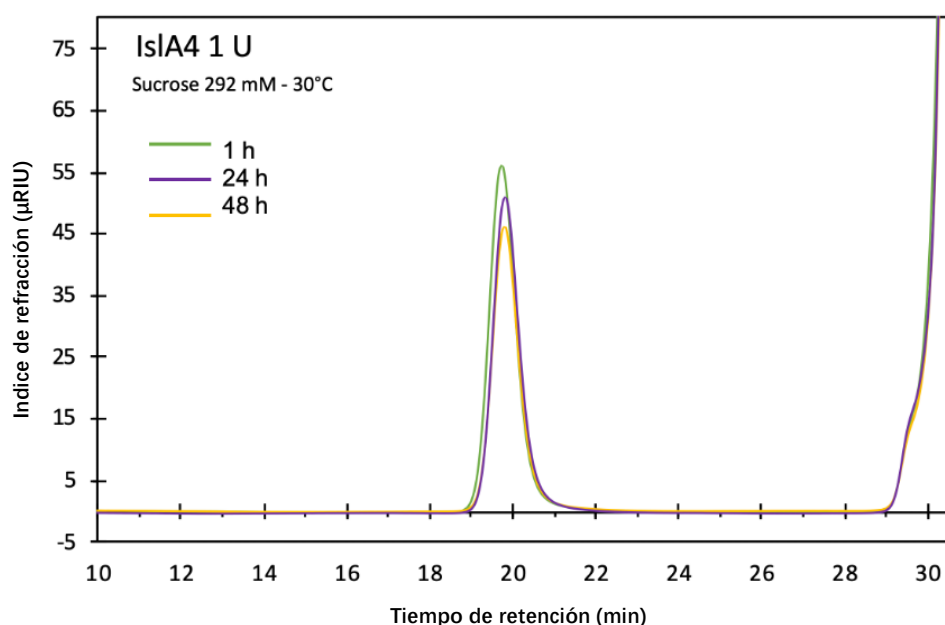


Figura 7:11 Cuantificación de polímero de alto peso molecular de IsIA4 a 30°C y 292 mM de sacarosa.

Como se puede observar, IsIA4 es capaz de producir hasta 24 g/L de pAPM durante la primera hora, y a medida que avanza la reacción, la concentración de polímero decrece a 20g/L. La cuantificación del polímero producido se resume en la Tabla 7:4. Por otra parte, a 20°C IsIA4 produce un 24% menos polímero durante la primera hora y un 15% menos cuando alcanza el 90% de conversión de sacarosa.

Si bien no es una disminución significativa, los resultados parecen corroborar que, al igual que la levansacarasa de *B. subtilis*, SacB [48], IsIA4 presenta, en menor medida, a 30°C, actividad inulinasa hacia tiempos finales de reacción, lo que explicaría el decremento en la concentración final del polímero.

Tabla 7:4. Concentración de polímero de alto peso molecular a 292 mM de sustrato producido por IsIA4 a 1 U y 30°C

Tiempo (h)	Concentración (g/L) con 292 mM de sacarosa
1	24.4 ± 0.61
24	22.8 ± 1.46
48	20.1 ± 0.42

El análisis de la concentración de polímero en términos de porcentajes indica que el 25.6% de la sacarosa consumida se dirige a la formación de pAPM, mientras que el 13.4% se dirige a la formación de productos de bajo peso molecular. A pesar de que la enzima es predominantemente hidrolítica, estos resultados demuestran que a un porcentaje de conversión de sacarosa del 90%, la reacción de transferencia se dirige en su mayoría a la formación de polímero de alto peso molecular. Este resultado permite concluir que IsIA4 presenta un mecanismo de elongación procesivo [9], [16], ya que es capaz de producir principalmente polímero de alto peso molecular y no se observaron en el cromatograma de la Figura 7:11 productos de bajo peso molecular.

7.5 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL AUMENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO EN EL MECANISMO DE ELONGACIÓN DE LAS VERSIONES TRUNCADAS

7.5.1 CARACTERIZACIÓN DE LA REACCIÓN Y PERFIL DE PRODUCTOS DE ISLA4 A 1170 mM DE SUSTRATO

7.5.1.1 ANÁLISIS DE LA REACCIÓN Y RELACIÓN HIDRÓLISIS / TRANSFERENCIA DE ISLA4 A 1170 mM DE SUSTRATO

De acuerdo con algunos autores, la especificidad de reacción (hidrólisis o transferencia), así como la especificidad de producto (tipo y tamaño del polímero o FOS sintetizados) depende fuertemente de las condiciones de reacción [16], [41], [47]. Estudios previos realizados con IsIA4 demostraron que la actividad transferasa es favorecida por las altas concentraciones de sustrato (1170 mM y 2064 mM de sacarosa), resultando en un incremento en la síntesis de una amplia variedad de FOS, fenómeno que es acompañado de un incremento en la actividad transferasa y un posible cambio en la procesividad de la enzima [47].

Con el fin de estudiar el efecto de la concentración de sustrato en las versiones truncadas con y sin la región N₁₀₀ terminal en el mecanismo de elongación, se analizó la reacción y se determinó el perfil de productos de ambas versiones truncadas utilizando 1170 mM de sacarosa, es decir, una concentración cuatro veces mayor a la concentración utilizada para los ensayos anteriores (292 mM). La Figura 7:12A muestra la cinética de una reacción de IsIA4 a 1170 mM, que sugiere que el sustrato no se consume por completo a las 48 h de reacción sin embargo, la reacción se lleva a cabo, puesto que se observa presencia de monosacáridos (glucosa y fructosa) en la parte superior de la placa. Así mismo, se observa la formación de polímero desde los primeros 30 minutos de reacción, y con más intensidad a tiempos finales. También se observa la formación de FOS con un DP>5 que permanecen constantes hacia el final de la reacción.

Adicionalmente, en la Figura 7:12B se muestran la cuantificación de consumo de sustrato y la especificidad hacia la hidrólisis / transferencia, donde se observa que a 48 h de reacción el sustrato se ha consumido en un 63%, y es hasta las 70 h de reacción que la enzima alcanza un 80% de conversión. Cabe resaltar que, a tiempos iniciales, la enzima es totalmente hidrolítica, y que la relación hidrólisis / transferencia alcanza su valor constante de 45/55 a las 48h de reacción. Una comparación entre los valores de H/T obtenidos a 292 mM y 1170 mM de sacarosa, con un porcentaje de conversión de sacarosa entre el 80 y 90%, permite concluir que dicha relación no cambia con la concentración de sustrato.

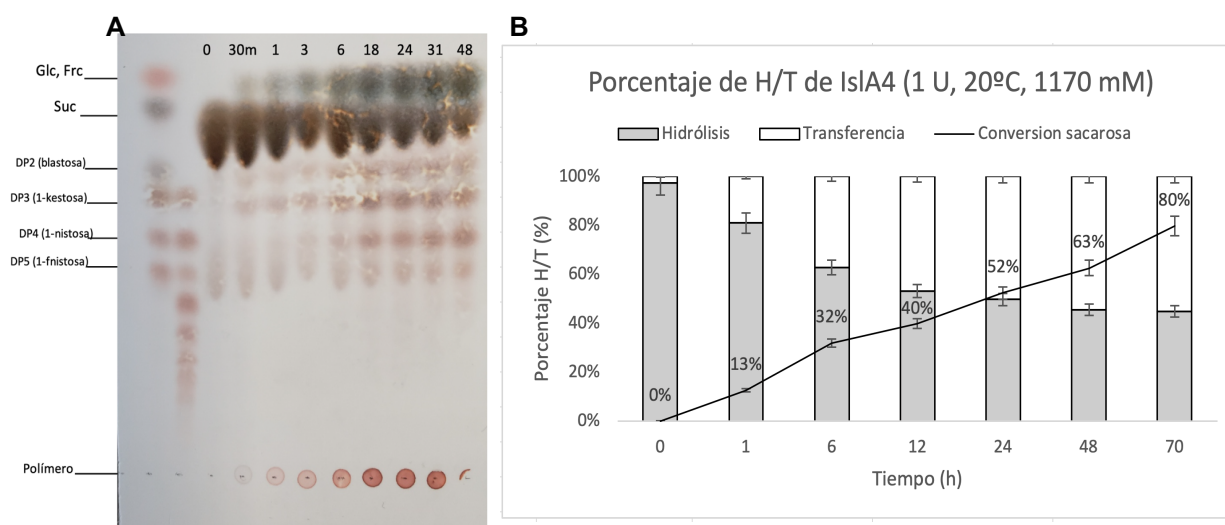


Figura 7:12 **A**) Ensayo de cromatografía en capa fina (TLC) del perfil de productos de IsIA4 con 1 U, 20°C y sacarosa 1170 mM. Estándares: Glc = glucosa, Frc = Fructosa, Suc: sacarosa, B: blastosa, 1-K: 1-kestosa, 1-N: 1-nistosa, 1-FN: 1-fructofuranosil nistosa. **B**) Relación H/T y consumo de sacarosa de IsIA4 a 20°C, a 48 h de reacción

7.5.1.2 PERFIL DE PRODUCTOS DE ISLA4 A 1170MM DE SUSTRATO

En cuanto al perfil de productos, este se determinó al 60% de conversión de sacarosa, demostrando la presencia de varios FOS entre los que se encuentran la 1-kestosa, blastosa, 6-kestosa, levanobiosa, ercosa, nistosa, 1,6-nistosa, inulotriosa (F3-I), blastotriosa, levanotriosa (F3-L), 1,6-kestopentaosa, inulotetraosa (F4-I), blastotetraosa, 6,6-kestopentaosa, 1,2-kestopentaosa (GF5-I), levanotetraosa (F4-L), 6-neo kestopentaosa, inulopentaosa (F5-I) y blastopentaosa, además de algunos productos (*) que no pudieron ser indentificadas con los estándares utilizados (Figura 7:13). También se identificaron FOS con un DP de hasta 15. Los resultados del perfil de productos determinado a 292 mM y 1170 mM de sacarosa no son comparables, dado que el porcentaje de conversión de sacarosa al que fueron determinados no es similar (90% y 63% de conversión, respectivamente). Sin embargo, a 1170 mM se observó una mayor diversidad de FOS, los cuales presentan un DP >10.

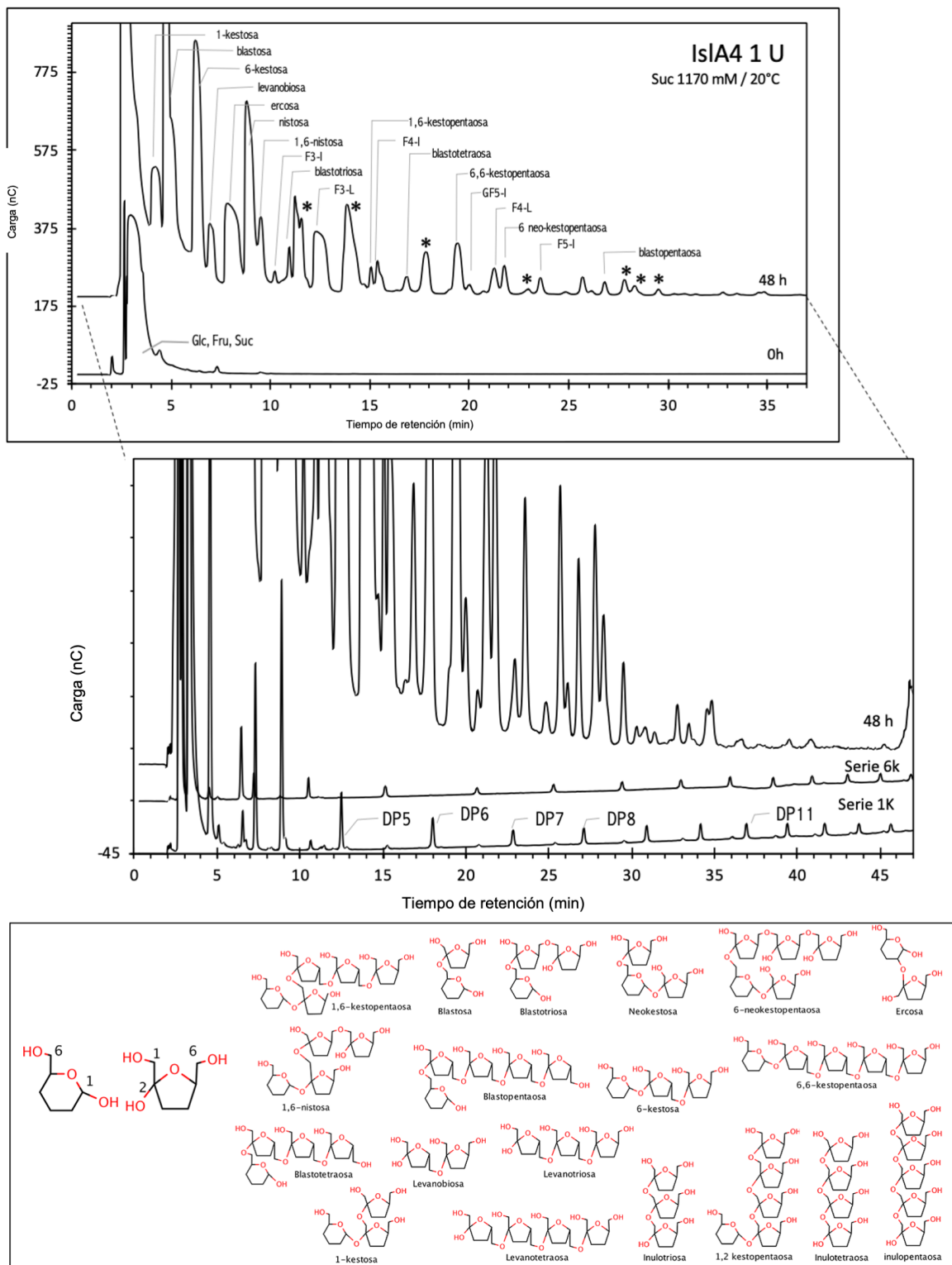


Figura 7:13 Perfil de productos de ISIA4 a 1 U/mL, 20°C y 1170 mM. Se muestran las estructuras de los productos sintetizados y la posición de los enlaces. Señal no identificada con los estándares utilizados (*).

Respecto a la cuantificación de pAPM, la Figura 7:14 muestra el cromatograma de la producción de polímero con 1170 mM de sacarosa.

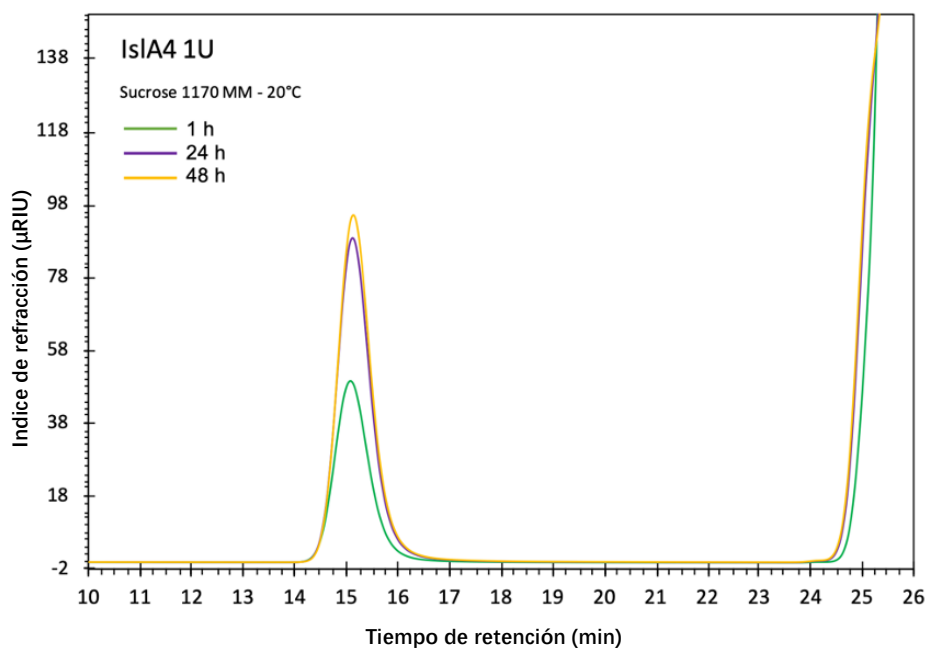


Figura 7:14 Cuantificación de polímero de alto peso molecular de IsIA4 a 1170 mM de sustrato

A una concentración de 1170 mM de sacarosa, el 31% de los productos sintetizados corresponde a polímero de alto peso molecular, mientras que el 24% corresponde a productos de bajo peso molecular.

Una comparación con los resultados obtenidos a 292 mM de sustrato no es posible debido a diferencias en el porcentaje de conversión de sacarosa al cual se realizaron las determinaciones, sin embargo, los resultados de IsIA4 a 1170 mM resaltan que la reacción de transferencia favorece en un 23% la síntesis de polímero de alto peso molecular sobre los productos de bajo peso molecular.

Tabla 7:5 Concentración de polímero de alto peso molecular a 1170 mM, producido por IsIA4 a 1 U y 20°C

Tiempo (h)	Concentración (g/L) con 1170 mM de sacarosa
1	35.1 ± 0.94
24	61.9 ± 1.2
48	78.4 ± 0.36

7.5.2 CARACTERIZACIÓN DE LA REACCIÓN Y EL PERFIL DE PRODUCTOS DE ISLA5 A 1170 mM DE SUSTRATO

7.5.2.1 ANÁLISIS DE LA REACCIÓN Y RELACIÓN HIDRÓLISIS / TRANSFERENCIA DE ISLA5 A 1170 mM DE SUSTRATO

Con el fin de comparar el comportamiento de IsIA5 con los resultados obtenidos para IsIA4, así como estudiar el efecto de la concentración de sustrato en dicha versión truncada, se llevaron a cabo reacciones a 1170 mM de sacarosa, 1 U/mL de enzima y 20°C en buffer de acetatos 50 mM, CaCl₂ 1 mM y pH 6.0. Con cuatro veces más sustrato, se puede observar la presencia de FOS con un DP mayor a 5 y producción de polímero desde la primera hora de reacción (Figura 7:15A), mientras que con 292 mM de sustrato, la enzima sólo es capaz de producir FOS con un DP de hasta 4. El porcentaje de conversión de sacarosa muestra que a las 24 h se ha consumido un 82% del sustrato, alcanzando el 98% de conversión tras 48 h de reacción. También se observa que, a tiempos iniciales, predomina la actividad hidrolítica, sin embargo, cuando se alcanza el 90% de conversión, la relación H/T se establece en 32/68 (Figura 7:15B).

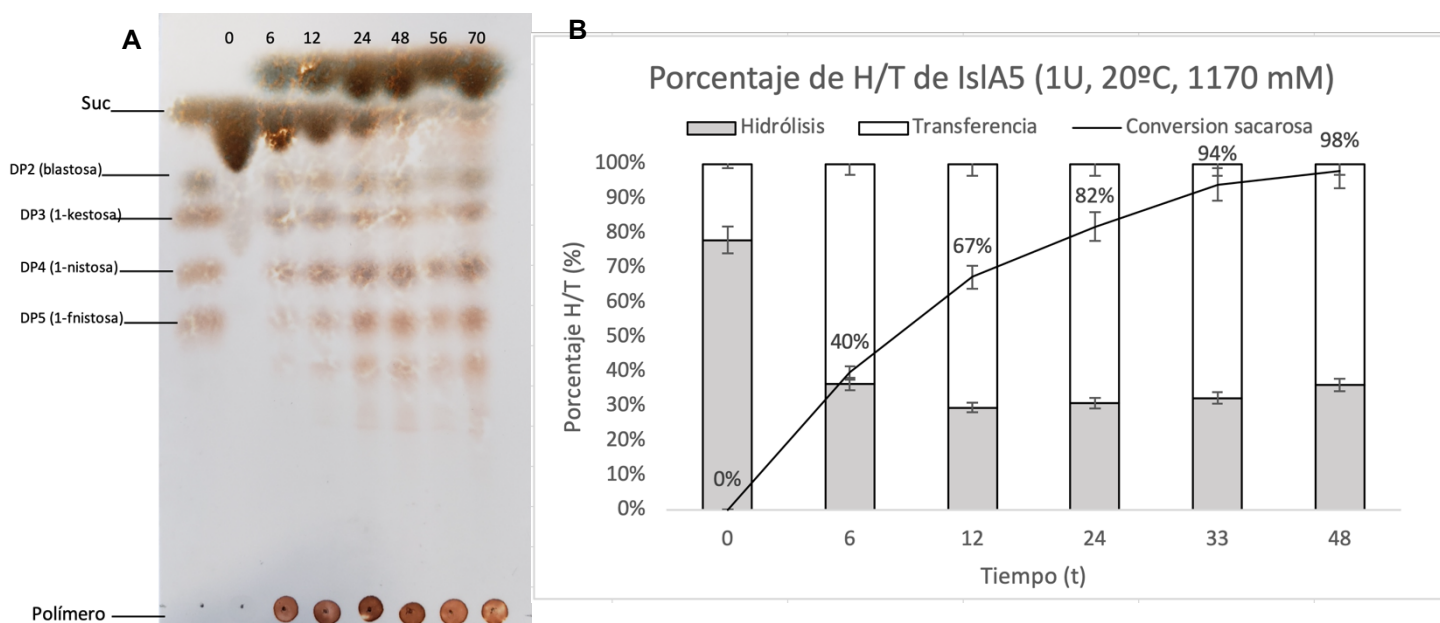


Figura 7:15 **A**) Ensayo de cromatografía en capa fina (TLC) del perfil de productos de IsIA5 con 1 U, 20°C y 1170 mM de sacarosa. Estándares: Glc = glucosa, Frc = Fructosa, Suc: sacarosa, B: blastosa, 1-K: 1-kestosa, 1-N: 1-nistosa, 1-FN: 1-fructofuranosil nistosa. **B**) Relación H/T y consumo de sacarosa de IsIA5 a 20°C, a 48 h de reacción.

La comparación de estos resultados con aquellos obtenidos a 292 mM de sustrato muestra que la relación H/T se invierte, pasando de ser una enzima preferentemente hidrolítica (H/T= 62/38 al 65% de conversión, 292 mM) a transferasa (30/70 al 67% de conversión, 1170 mM). Este efecto ya había sido reportado con IsIA4, utilizando siete veces más sustrato, es decir, utilizando 292 mM y 2046 mM de sacarosa [47]. Sin embargo, para IsIA5 el cambio se observa con tan solo cuatro veces más sustrato. Un fenómeno similar ya había sido reportado por Olvera y cols. en 2012, como resultado de un incremento considerable en la actividad transglicosilasa. La determinación de las constantes cinéticas globales y de hidrólisis y transferencia (k_m y k_{cat}) de FTFs quiméricas permitió identificar un aumento en la k_{cat} de transferencia, mientras que el valor de k_m permaneció inalterado, concluyendo así que los cambios en las constantes globales son debidos al aumento de la actividad transglicosilasa [33].

Adicionalmente, se ha reportado que la actividad transferasa predomina a altas concentraciones de sustrato, inhibiendo la actividad hidrolítica [3], [50]. Es probable que el efecto observado en Isla5 respecto al alto porcentaje de actividad transferasa se deba al aumento de las constantes cinéticas de transferencia, más que a la inhibición o disminución de la hidrólisis, o bien, a que las condiciones de reacción favorecen la actividad transferasa. Sin embargo, la determinación de dichas constantes es necesaria para conocer cómo estas se ven afectadas con una mayor concentración de sustrato.

7.5.2.2 PERFIL DE PRODUCTOS DE ISLA5 A 1170MM DE SUSTRATO

El análisis del perfil de productos por HPAEC-PAD permitió identificar una amplia variedad de FOS: 1-kestosa, blastosa, inulobiosa, levanobiosa, neo-kestosa, ercosa, 1,6-nistosa, blastoriosa, 6,6-kestopentaosa, levanotriosa, 1,2-nistosa, 6-neo-nistosa, 1,6-kestopentaosa, 1,2-kestopentaosa, 6-neo kestopentaosa y inulopentaosa, además de productos (*) que no pudieron ser indentificadas con los estándares utilizados. Finalmente, se observa la producción de FOS con un DP de hasta 14, lo que sugiere la producción de productos de bajo peso molecular (Figura 7:16).

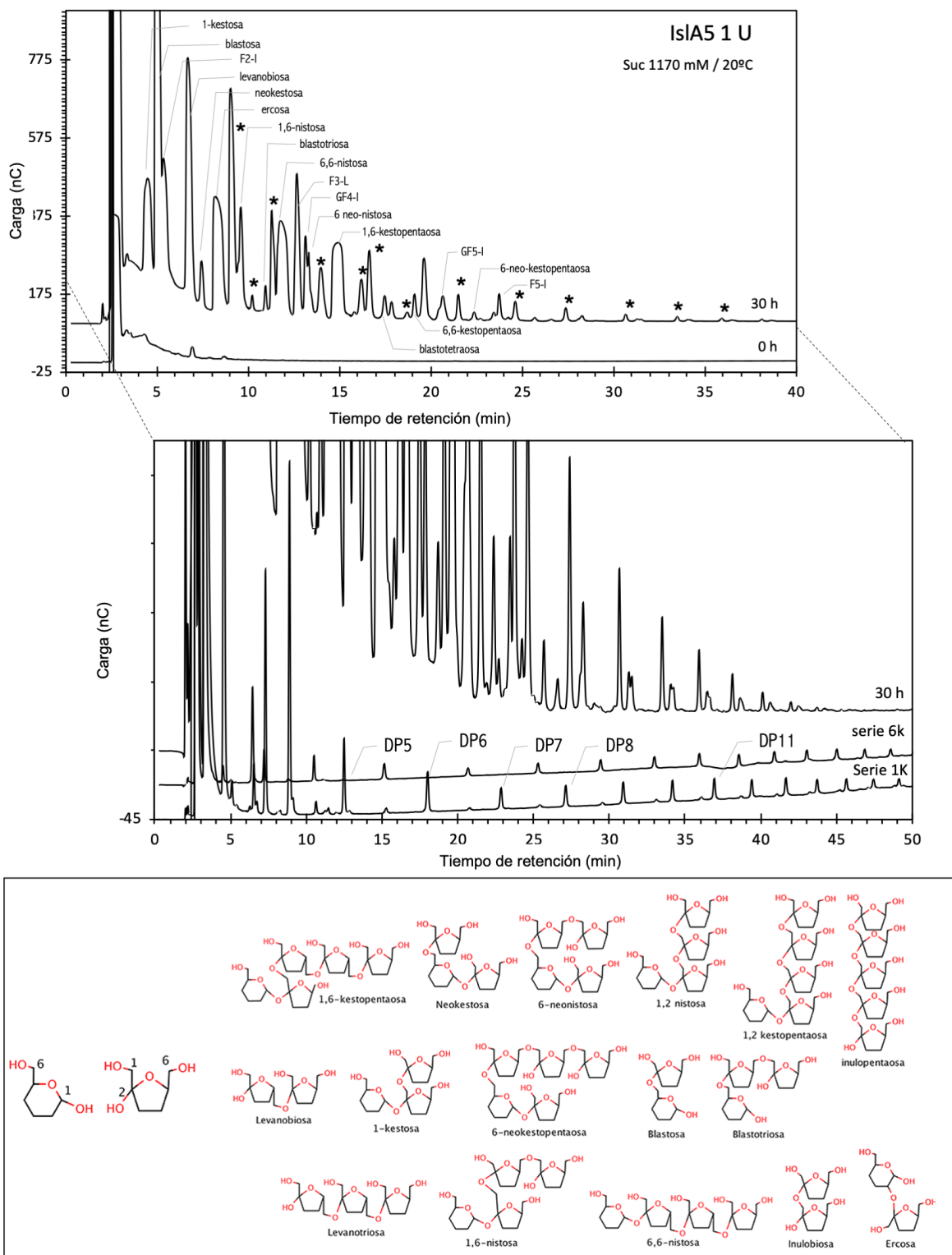


Figura 7:16 Perfil de productos de IsIA5 a 1 U/mL, 20°C y 1170 mM de sustrato. Se muestran las estructuras de productos sintetizados (en negro glucosa, en blanco fructosa). Señal no identificada con los estándares utilizados (*)

También se realizó la cuantificación de polímero de alto peso molecular de las reacciones llevadas a cabo por IsIA5 a 1170 mM de sustrato, mediante cromatografía de permeación en gel (GPC). El cromatograma de la Figura 7:17 muestra la presencia tanto de polímero de alto peso molecular como productos de bajo peso molecular, estos últimos aumentando en concentración de forma proporcional al tiempo.

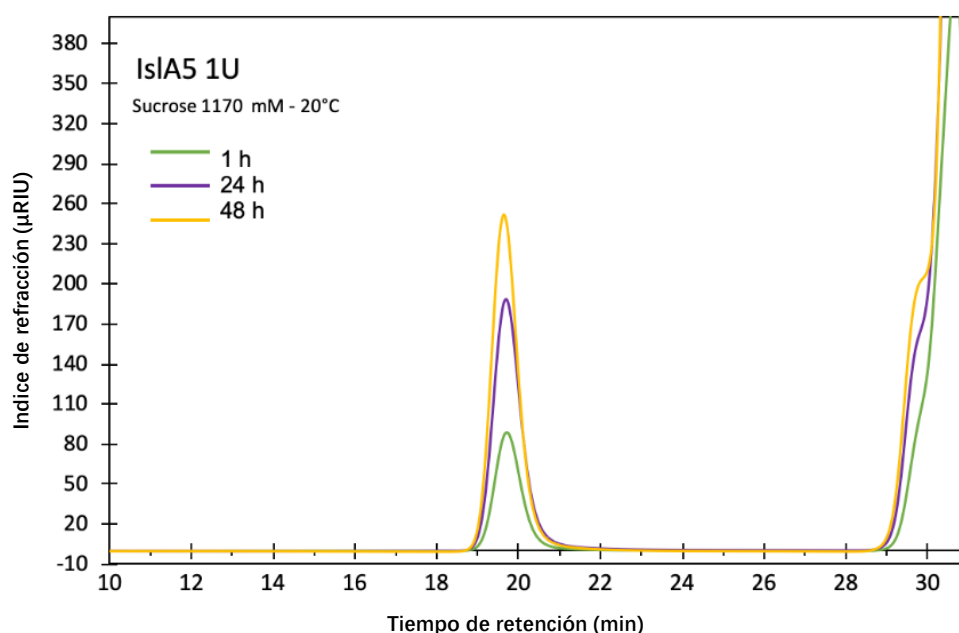


Figura 7:17 Cuantificación de polímero de alto peso molecular de IsIA5 a 1170 mM

La cuantificación del pAPM indica que a 48 h de reacción la enzima produce casi 90g/L de polímero al final de esta. Cuando se realiza una comparación de la concentración de polímero producido por IsIA5 al mismo porcentaje de conversión (35%), se observa que esta enzima produce tan sólo 9.6 g/L con 292 mM de sustrato, lo que representa un 86% menos de lo que produce a 1170 mM (69.7g/L) (Tabla 7:6). Sin embargo, en términos de porcentaje, la cantidad de polímero producido por IsIA5 es similar (18%) para ambas concentraciones de sacarosa.

Tabla 7:6 Concentración de polímero de alto peso molecular a 1 U, 20°C y 1170 mM de sustrato.

Tiempo (h)	Concentración (g/L) con 1170 mM de sacarosa
1	69.7 ± 0.94
24	85.8 ± 0.19
48	89.5 ± 0.67

Respecto a la hidrólisis de polímero a tiempo finales, se observa que el polímero no es hidrolizado por IsIA5 cuando esta alcanza un 98% de sacarosa sin embargo, es probable que la hidrólisis del polímero ocurra una vez consumido el sustrato en su totalidad, como fue observado anteriormente para la LS unidominio de *B. subtilis* [48]. Para el caso de IsIA4 y cuatro veces más sustrato, este fenómeno no fue observado debido a que sólo se alcanzó un 80% de conversión.

8. DISCUSIÓN

En este trabajo, la comparación de las características y los productos de reacción de las versiones truncadas IsIA4 (que cuenta con el dominio catalítico, y la región N₁₀₀ en el extremo N-terminal) e IsIA5 (únicamente el dominio catalítico) permitió estudiar la importancia y posible función de la región N₁₀₀ terminal de la inulosacarasa IsIA de *L. citreum* CW28.

8.1 LA REMOCIÓN DE LA REGIÓN N₁₀₀ TERMINAL DE LA INULOSACARASA ISIA AFECTA LA TEMPERATURA ÓPTIMA DE REACCIÓN

La determinación de la temperatura óptima de reacción para IsIA5 demostró que la delección de la región N₁₀₀ terminal afecta fuertemente esta propiedad, pues mientras que IsIA4 exhibe una temperatura óptima de 30°C, la remoción de la región N₁₀₀ terminal en IsIA5 causa un descenso de la temperatura óptima de 10°C, siendo la temperatura óptima 20°C.

Cuando se comparan las actividades de ambas versiones truncadas a 20°C se observa que la actividad de IsIA4 es 65% menor a la de IsIA5. Sin embargo, a pesar de que IsIA4 fue evaluada en condiciones subóptimas de temperatura, la enzima fue capaz de convertir 90% de sustrato en 24 h (sacarosa a 292 mM), mientras que IsIA5 sólo alcanzó un 65% de conversión después de 70 h de reacción. Al comparar la actividad de estas dos versiones a 30°C, que es la temperatura óptima de reacción para IsIA4, se observó que IsIA5 exhibe menos del 1% de la actividad específica de IsIA4. Mientras que, al comparar el valor de actividad de ambas enzimas en sus condiciones óptimas de reacción (30°C para IsIA4 y 20°C para IsIA5) se observa que la actividad enzimática de IsIA5 es hasta un 59% menor que la de IsIA4.

Cuando se analizaron y compararon cinéticas de consumo de sustrato durante la reacción, se observó que las pendientes, que son un reflejo de la velocidad inicial, son muy diferentes. El consumo de sustrato de IsIA5 fue mucho más lento que el de la enzima IsIA4, tanto en condiciones óptimas para IsIA4 (30°C) como a 20°C, lo que sugiere que remover la región N₁₀₀ terminal afecta la velocidad de reacción de la enzima (Figura 8:1). Sin embargo, es necesario determinar las constantes cinéticas de ambas versiones para cuantificar este efecto.

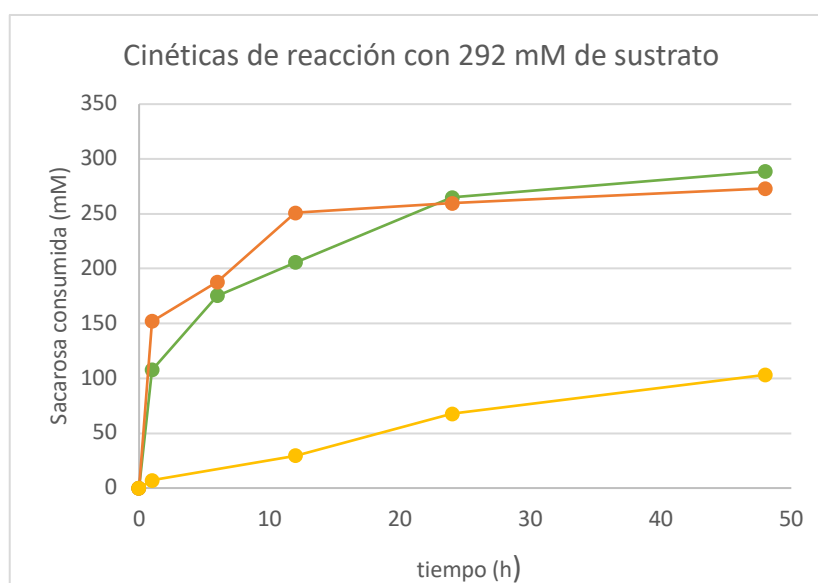


Figura 8:1 Curva de progreso de las reacciones llevadas a cabo por IsIA4 e IsIA5 con 292 mM de sacarosa.

○ IsIA4, 30°C, 292 mM, ● IsIA4, 20°C, 292 mM, ● IsIA5, 20°C, 292 mM

Estas observaciones en conjunto demuestran que la región N₁₀₀ terminal esta involucrada en la actividad de la enzima y en la temperatura óptima de reacción, efecto probablemente debido a la pérdida de interacciones importantes de la región N₁₀₀ terminal con el dominio catalítico que están involucradas en la catálisis de la enzima o bien, en su termoestabilidad.

El análisis de la composición aminoacídica de la región N₁₀₀ terminal indica que el 24% de dicha región esta conformada por aminoácidos cargados y polares

(principalmente aspartato y asparagina) [51]. De acuerdo con diversos autores [52]–[54], los residuos polares tienen cargas parciales significativas capaces de formar puentes de hidrógeno y otras interacciones electrostáticas menos específicas entre ellos y con residuos cargados. Se ha demostrado que la actividad catalítica se deriva de la estabilización electrostática del estado de transición, y que estas mismas interacciones pueden estabilizar o desestabilizar intermediarios de las vías cinéticas [52]. Se sugiere que la remoción de la región N₁₀₀ terminal probablemente afecta el microambiente cerca del sitio catalítico, lo que lleva a un cambio en las propiedades cinéticas de la enzima. La dilucidación de la estructura cristalográfica es fundamental para entender cómo la región N₁₀₀ terminal interacciona con el sitio catalítico.

Por otra parte, se ha reportado que las interacciones electrostáticas modulan la estabilidad del plegamiento de las proteínas ya que la energía de solvatación disminuye por efecto de residuos cargados en la superficie de la proteína [52], [55]. Para comprobar el efecto de la región N₁₀₀ terminal en la estabilidad enzimática, se realizó un ensayo para determinar el tiempo de vida media de la enzima IsIA5 al almacenamiento. El ensayo se llevó a cabo incubando la enzima a 35°C, temperatura a la cual se ha determinado el tiempo de vida media de las otras versiones truncadas generadas de IsIA, a una concentración de sustrato (sacarosa) de 1170 mM, concentración a la cual si es posible evaluar la actividad enzimática. Como se muestra la Figura 8:2, se observa una importante caída de la estabilidad de IsIA5 en la primera hora de incubación a 35°C, perdiendo hasta un 56% de actividad. Adicionalmente, después de 3.5 h de incubación la enzima presenta una disminución de actividad del 73%. El tiempo de vida media fue calculado en 112 min ± 7.2 min, que comprado con el de IsIA4 (126 min) [56], a la misma temperatura pero a una concentración menor de sacarosa (292 mM), refleja una disminución de sólo 14min.

Con excepción de la enzima silvestre y la versión truncada Δ NIsIA2 (Tabla 1:3), IsIA5 presenta el menor tiempo de vida media de la batería de enzimas truncadas de IsIA, sin embargo, la diferencia de tiempo de vida media entre la versión inmediata anterior (IsIA4) e IsIA5 es menor en comparación con la diferencia de tiempo de vida media entre IsIA2 e IsIA3 (60 min) y entre IsIA3 e IsIA4 (222 min). Esto probablemente debido a que las regiones eliminadas en IsIA2 e IsIA3 son mayores a 100 aminoácidos, derivando en un mayor efecto cuando son removidas.

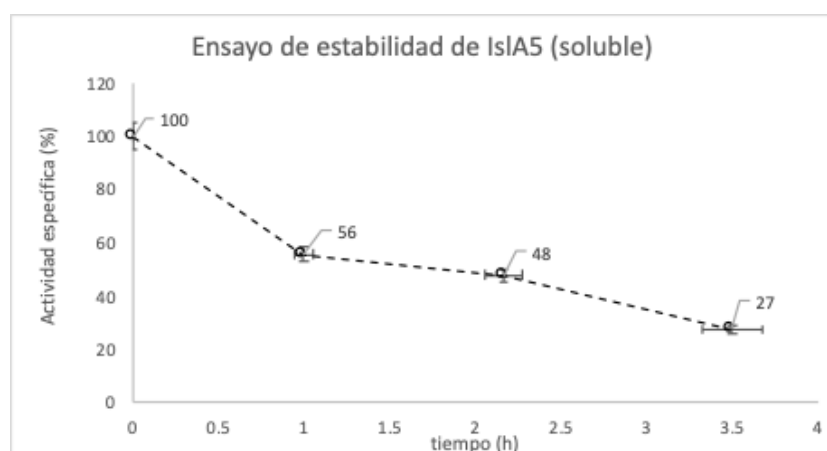


Figura 8:2 Ensayo de estabilidad al almacenamiento de IsIA5, a 35°C. El ensayo se llevó a cabo a pH 6.0 y 1170 mM de sustrato.

La comparación del tiempo de vida media de IsIA5 con la enzima IsIA4 indica que no existe un cambio significativo en la estabilidad, lo que sugiere que la baja actividad exhibida por IsIA5 es consecuencia directa de la eliminación de interacciones probablemente electrostáticas que participan con el sitio catalítico, y cuya ausencia se refleja directamente en las propiedades cinéticas, como fue anteriormente sugerido.

Por otra parte, es bien sabido que las interacciones hidrofóbicas, los puentes de hidrógeno, los puentes salinos y disulfuros, la estabilización de loops, la reducción de la entropía de desplegamiento y las fuerzas de van der Waals son las principales fuerzas que contribuyen a la estabilidad de una proteína [57]. En este sentido, es

válido sugerir que la remoción de la región N₁₀₀ terminal pudo afectar algunas de estas interacciones, teniendo fuertes repercusiones en la actividad catalítica y propiedades bioquímicas de la enzima [58]. Se sugiere que la región N₁₀₀ terminal mantiene interacciones importantes tipo puente de hidrógeno, hidrofóbicas y/o electrostáticas con la misma estructura protéica o con los oligosacáridos aceptores o productos de reacción, y cuando dicha región es removida, estas se ven afectadas, teniendo como resultado una disminución en la temperatura óptima, en la actividad catalítica y hasta en el comportamiento cinético de IslA5. El estudio de dichas interacciones con el resto de la enzima, la búsqueda de motivos que participen en este tipo de interacciones y estudios de mutagénesis en la zona podrían dilucidar la intervención de la región N₁₀₀ terminal en la interacción con el sustrato y/o producto enzimático y en el comportamiento cinético de dicha enzima.

8.2 PARTICIPACIÓN DE LA REGIÓN N₁₀₀ TERMINAL EN LA REACCIÓN DE HIDRÓLISIS VS TRANSFERENCIA

Cuando se utiliza como sustrato sacarosa, las fructansacarosas son capaces de desarrollar dos tipos de reacciones: la de transferencia, cuando el residuo fructosilo de la sacarosa es transferido a una molécula de sacarosa o a un oligosacárido en crecimiento produciendo FOS de un mayor DP o polímero; y de hidrólisis, cuando el residuo fructosilo es transferido al agua produciendo solo la hidrólisis de la sacarosa. Para investigar si la región N₁₀₀ terminal participa en la especificidad hacia estas reacciones, se compararon los porcentajes de dichas reacciones en ambas versiones truncadas. A un 36% de conversión IsIA4 a 20°C, transfiere un 46% de los residuos fructosilo que toma de la sacarosa a FOS o polímero, mientras que IsIA5 presenta un 32% de transferencia, es decir, un porcentaje de transferencia apenas 14% menor en comparación con IsIA4.

Al comparar los efectos en la especificidad de productos de la transferencia, indicada por la relación de productos de alto y bajo peso molecular, se puede observar que es del 18.5% de polímero de alto peso molecular y del 19.2% de productos de bajo peso molecular para IsIA5 a 292 mM de sustrato, es decir una relación 1:1 (Tabla 8:1). Mientras que la enzima IsIA4 presenta 18.9% de productos de alto peso molecular y un 34.1% de productos de bajo peso molecular, lo que representa una relación 2:1 aproximadamente.

Tabla 8:1 Porcentaje de polímero de alto y bajo peso molecular sintetizado por las versiones truncadas a 292 mM de sacarosa

	% Conversión	% Hidrólisis	Polímero de alto peso molecular (%)	Productos de bajo peso molecular (%)
292 mM de sacarosa				
30°C IsIA4	89 ± 0.23	61 ± 0.58	25.6 ± 1.47	13.4 ± 0.06
20°C , IsIA4	91 ± 0.04	47 ± 0.05	18.9 ± 1.56	34.1 ± 1.98
20°C , IsIA5	65 ± 0.27	62 ± 0.18	18.5 ± 2.02	19.2 ± 2.00

A pesar de que no es posible realizar una comparación entre IsIA4 e IsIA5 a 20°C debido a que IsIA5 no alcanzó un porcentaje de conversión de sacarosa similar al de IsIA4, la distribución de productos de alto y bajo peso molecular sugiere que la región N₁₀₀ terminal participa en la reacción de transferencia de fructosa para los productos de bajo peso molecular, pues al ser eliminada, la enzima pierde la capacidad de dirigir los productos de transferencia a productos de bajo peso molecular, mientras que el rendimiento en la producción de polímero también disminuye de forma considerable.

Analizando el perfil de FOS observado para ambas versiones truncadas a 20°C y 292 mM de sacarosa, se aprecian diferencias que pueden ser analizadas a través de la identificación de los FOS iniciadores, tal y como fue reportado para la LS SacB [59]. De acuerdo con los resultados, tanto IsIA4 como IsIA5 son capaces de sintetizar 1-kestosa y 6-kestosa, así mismo, se observa la formación de los iniciadores secundarios, blastosa e inulobiosa (Figura 8:3). Estos resultados demuestran que ambas enzimas, con y sin la región N₁₀₀ terminal, tienen baja regioselectividad en los primeros pasos de elongación, de forma similar a lo observado para la levansacarasa SacB de *B. subtilis* [12], [59]. Sin embargo, es interesante observar que en IsIA5 productos con un grado de polimerización de 4 como la 1,2 nistosa (GF4-I) y 6,6 nistosa, son observados al final de la reacción, mientras que estos no están presentes en las reacciones con IsIA4.

La acumulación de productos con un grado de polimerización de 4 en IsIA5 y no en IsIA4 sugiere que estos productos no pueden ser usados como aceptores de forma eficiente por la ausencia de la región N₁₀₀ terminal, por lo que se acumulan. En este sentido, se propone el estudio de reacciones de aceptor con los productos acumulados para determinar su participación en la elongación del polímero.

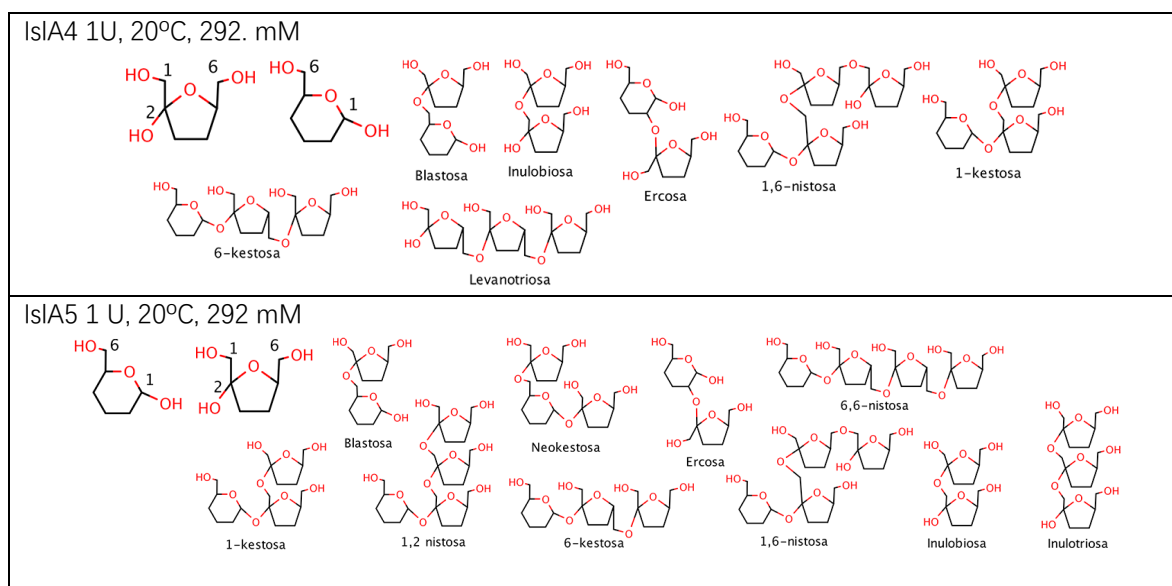


Figura 8.3. Esquemización de los productos de reacción de IsIA4 e IsIA5 a 20°C y 292 mM de sacarosa

El análisis del perfil de FOS de IsIA4 muestra que esta enzima es capaz de acumular levanotriosa (F3-L), misma que no es acumulada en IsIA5, probablemente debido a que dicha molécula es usada como aceptor para la elongación del polímero. Además, el hecho de que no se identificaran más productos de la serie de las oligolevanas con un DP mayor (por ejemplo, levanotetraosa o levanopentaosa) sugiere que IsIA5 no es capaz de elongar FOS con un DP más allá de 3 con enlace β -(2,6) o bien, que moléculas con un DP mayor son utilizadas como aceptores para la formación de polímero.

Por otra parte, en el perfil de IsIA5 se observa la formación de neokestosa, esta molécula ha sido mencionada como parte de los FOS iniciadores en fructansacarosas sin embargo su ausencia en IsIA4 puede deberse a que este FOS es hidrolizado para la formación de blastosa, fenómeno antes descrito en levansacarosas [59]. El hecho de que pueda ser identificado en el perfil de productos de IsIA5 sugiere que parte de éste podría ser hidrolizado para formar blastosa, pero de forma menos eficiente que en IsIA4 y por eso se acumula.

Por el contrario, la inulotriosa (F3-I) no fue observada en el perfil de FOS de IsIA4, pero si hay acumulación de inulobiosa (F2-I), lo que sugiere que la enzima es más afín por FOS cortos para su incorporación a la cadena de fructana en crecimiento. Así mismo, la presencia de inulotriosa en IsIA5 sugiere que estas oligoinulinas deben ser un grado de polimerización mayor para ser incorporadas a la formación de pAPM.

Los resultados anteriores permiten inferir que la eliminación de la región N₁₀₀ terminal otorga mayor flexibilidad a la regioselectividad de los subsitios de unión +1, +2 y +3 [9], [59], lo que se traduce en una mayor cantidad de intermediarios tanto de tipo levana como de tipo inulina. Así mismo, una mayor variedad de FOS podría influir directamente en el porcentaje de ramificación del polímero formado. Estudios de mutagénesis en los subsitios mencionados y del perfil de productos de dichas mutantes, así como la determinación del porcentaje de ramificación del polímero a través de la derivatización de fructanos parcialmente metilados son necesarios para determinar la influencia de estos subsitios en la especificidad de producto y enlace.

Finalmente, este trabajo muestra indudablemente que la región N₁₀₀ terminal no es necesaria para la producción de polímero de alto peso molecular. Si bien es cierto que la concentración de polímero producido es hasta un 39% menor en IsIA5 que la cantidad producida por IsIA4 a las mismas condiciones (20°C), se puede concluir que esta zona conformada por cien aminoácidos no representa una zona de

procesividad, por lo que no es indispensable para la elongación del polímero de alto peso molecular para la inulosacarasa IsIA de *L. citreum* CW28, contrario a lo reportado en la levansacarasa LevS (García-Paz, *datos no reportados*). Esta afirmación lleva a pensar que las determinantes responsables de la procesividad de la inulosacarasa probablemente se encuentran en el dominio catalítico. La remoción de la región N₁₀₀ terminal no llevó a la producción exclusiva de productos de bajo peso molecular, como fue inicialmente hipotetizado, sin embargo, afectó fuertemente su producción, así como la actividad enzimática y comportamiento cinético de la enzima.

8.3 EFECTOS DEL CAMBIO EN LA TEMPERATURA DE REACCIÓN EN ISIA4

En este trabajo también se hicieron observaciones interesantes cuando IsIA4 fue sometida a condiciones subóptimas de temperatura, comparadas con las condiciones óptimas de reacción. Respecto a la actividad enzimática, se encontró que a 20°C, IsIA4 pierde hasta el 84% de la actividad reportada en condiciones óptimas (30°C), probablemente debido a que la temperatura ejerce importantes efectos en las fuerzas que estabilizan/ desestabilizan la estructura de una proteína, lo que lleva a cambios en la actividad enzimática. La fuerza de las interacciones hidrofóbicas, por ejemplo, tiende a incrementar con la temperatura, así como la entropía conformacional [55].

Por otra parte, la disminución de la actividad enzimática puede ser explicada desde el modelo de equilibrio. Dicho modelo contempla un estado activo de la enzima (E_{act}), un estado inactivo (E_{inact}) no desnaturalizado y un estado desnaturalizado (X) [55]. Los estados activo e inactivo se encuentran en equilibrio en la temperatura óptima o de máxima actividad (T_{eq}), y una temperatura diferente llevará a un desequilibrio de las especies E_{act}/ E_{inact} . La base molecular de la transición de un estado activo a uno inactivo es un cambio conformacional reversible. Los efectos de la temperatura en las fuerzas que estabilizan y desestabilizan la proteína ofrece la oportunidad de cambiar la estructura de la enzima, lo que lleva a cambios en la actividad [60]. Esto explicaría la disminución en la actividad enzimática de IsIA4 cuando se somete a temperaturas por debajo de su óptima. Finalmente, la disminución de la temperatura también lleva a la disminución de la energía cinética de la reacción, afectando su velocidad.

Respecto al porcentaje de conversión de sacarosa, la comparación de los resultados de IsIA4 a 20°C y 30°C a un 90% de conversión, muestran un aumento en la transferencia del 14%. Cuando este resultado es analizado en función del porcentaje de productos de alto y bajo peso molecular, se observa una preferencia

de IsIA4 a 20°C por la formación de productos de bajo peso molecular, mientras que a 30°C se favorece la formación de polímero de alto peso molecular (Tabla 8:1). Esta observación resulta interesante porque sugiere que un cambio en la temperatura de reacción puede provocar un cambio en la especificidad de producto de la enzima. Charoenwongpaiboon y cols., (2019) proponen que bajas temperaturas de reacción ayudan a reducir las disociaciones de los oligosacáridos con la enzima [46], lo que podría explicar el aumento en el porcentaje de productos de bajo peso molecular formados por IsIA4 a 20°C.

Otra observación interesante fue que las diferencias encontradas en el perfil de productos de IsIA4 a diferentes temperaturas de reacción, tales como la síntesis a 30°C de FOS de tipo inulina con un DP de hasta 4 (1,2-nistosa e inulotetraosa), ausentes a 20°C, y que sugiere que a 30°C IsIA4 requiere de FOS de tipo inulina más largos para incorporarlos a la fructana en crecimiento; la presencia de levanotriosa a 20°C y de levanobiosa a 30°C, indicando que probablemente a una mayor temperatura de reacción, hay una mayor afinidad por FOS de tipo levana más cortos; y la acumulación de ercosa sólo a bajas temperaturas, como fue observado también para IsIA5 (Figura 8:4).

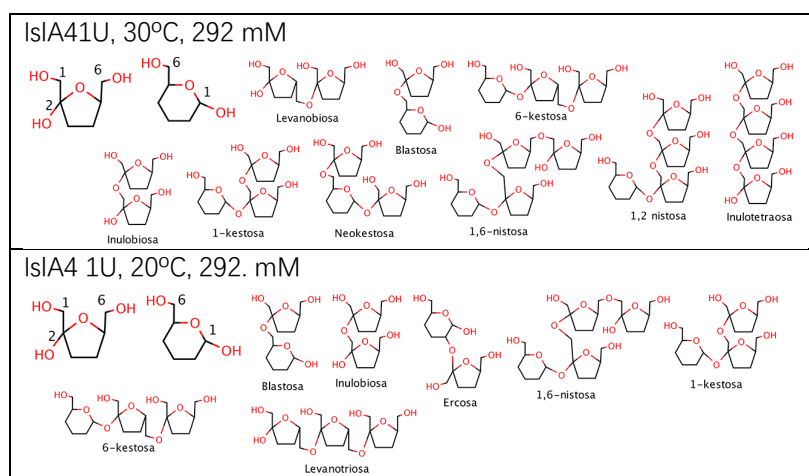


Figura 8:4 Esquematación de los productos de reacción de IsIA4 a 20°C y 30°C con 292 mM de sustrato

8.4 EFECTO DEL AUMENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y EN EL PERFIL DE PRODUCTOS.

El efecto del aumento de la concentración de sustrato en la actividad enzimática y en el perfil de productos ya había sido reportado para IsIA4 a 30°C [47] sin embargo, se desconocía su efecto a 20°C. Los resultados obtenidos muestran que la relación H/T de IsIA4 no se ve afectada por el aumento en la concentración de sustrato a 20°C, mientras que para el caso de IsIA5, dicha relación se invirtió, pasando de ser una enzima predominantemente hidrolítica a una transferasa.

El análisis del consumo de sacarosa en función del tiempo a dos diferentes concentraciones de sustrato sugiere que, a 1170 mM de sacarosa, hay un aumento en la velocidad de reacción de IsIA5, en comparación con lo observado a 292 mM (Figura 8:5, línea azul). Es probable que el comportamiento observado en IsIA5 sea consecuencia de la eliminación de la región N₁₀₀ terminal, ya que IsIA4 no aumenta de forma considerable su velocidad inicial con cuatro veces más sustrato. Se sugiere la determinación de las constantes cinéticas para conocer cómo estas se ven afectadas con la remoción de la región N₁₀₀ terminal.

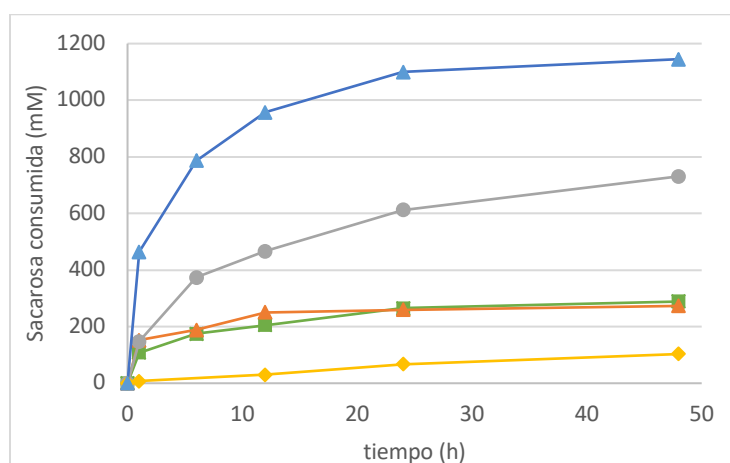


Figura 8:5 Curva de progreso de reacciones llevadas a cabo por IsIA4 e IsIA5 con 1170 mM de sacarosa. ● IsIA4, 30°C, 292 mM, ■ IsIA4, 20°C, 292 mM, ● IsIA4, 20°C, 1170 mM, ▲ IsIA5, 20°C, 292 mM, ▲ IsIA5, 20°C, 1170 mM,

El aumento en la velocidad de IslA5 al utilizar 4 veces más sustrato se ve acompañada de un aumento del 51% en los productos de bajo peso molecular, principalmente FOS con un DP de hasta 15. Mientras que en IslA4 se favorece la síntesis de polímero de alto peso molecular (hasta en un 31%), contrario a lo observado con 292 mM de sustrato (Tabla 8:2).

Tabla 8:2 Porcentaje de polímero de alto y bajo peso molecular sintetizado por las versiones truncadas a 1170 mM de sacarosa

	% Conversión	% Hidrólisis	Polímero de alto peso molecular (%)	Productos de bajo peso molecular (%)
1170 mM de sacarosa				
20°C, IslA4	63 ± 0.31	45 ± 0.26	31.1 ± 2.02	23.9 ± 0.03
20°C, IslA5	82 ± 0.63	31 ± 0.11	18.1 ± 0.19	50.9 ± 2.31

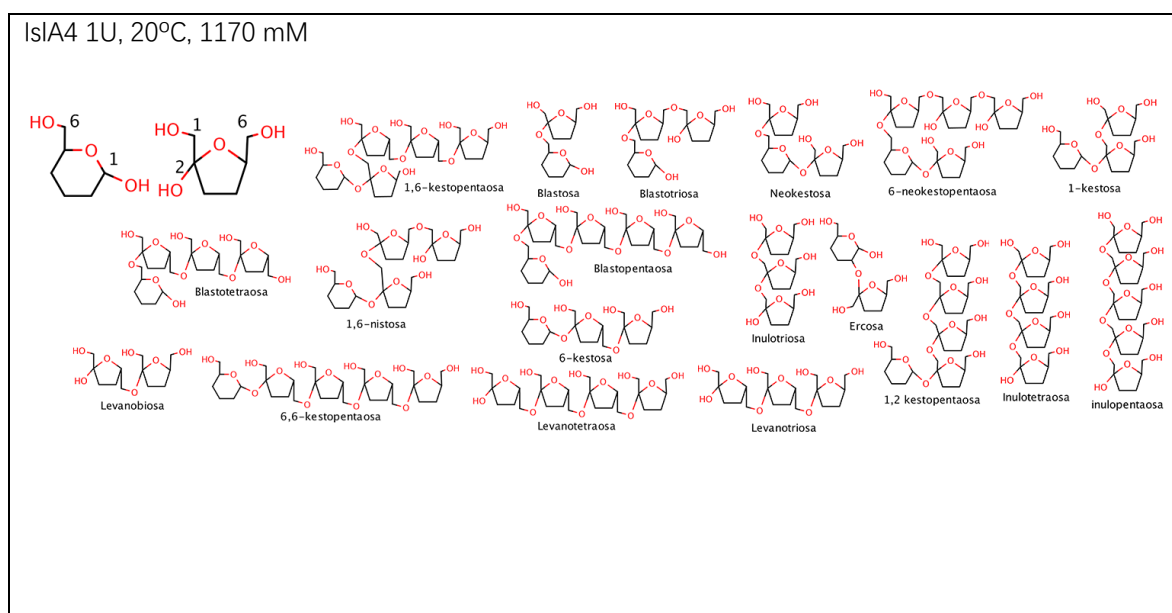
En resumen, el aumento en la velocidad de reacción de IslA5, así como el aumento en la transferencia hacia productos de bajo peso molecular reafirman la idea de que la región N₁₀₀ terminal influye sobre la velocidad de la enzima, y probablemente también en las constantes cinéticas de la misma. Así mismo, es probable que un aumento en la concentración de sacarosa puede llevar a la inhibición por sustrato de la reacción de hidrólisis en IslA5, favoreciendo la transferencia a productos de bajo peso molecular, fenómeno que ya ha sido documentado en otras fructansacarosas [31], [32], [61].

Respecto al perfil de productos observado para las versiones truncadas a 1170 mM de sacarosa destaca el amplio catálogo de productos sintetizados. Para el caso de IslA4, se observaron al menos 25 productos diferentes, 18 de los cuales fueron identificados a través de estándares. Entre estos se encuentran productos de la serie de los blastósidos (blastotriosa, blastotetraosa, blastopentaosa), productos de la serie 6-kestosa (6,6-kestopentaosa) y productos de la serie neo kestosa (6-neo kestopentaosa), ninguno de los cuales son producidos a 292 mM de sacarosa. Para

el caso del perfil de FOS de IsIA5 se observan al menos 29 productos diferentes con un DP>5, 16 de los cuales fueron identificados al compararlos con estándares.

El fenómeno observado probablemente es consecuencia de la alta concentración de sustrato en el medio de reacción, como fue anteriormente descrito [47], y probablemente la remoción de la región N₁₀₀ terminal no influye en este aspecto. Sin embargo, las diferencias observadas en el perfil de productos de ambas versiones truncadas sugieren una relajada regioespecificidad que puede estar directamente relacionada con la eliminación de la región N₁₀₀ terminal.

Una de las principales diferencias entre ambos perfiles es que IsIA4 es capaz de acumular productos de la serie de los blastósidos y oligolevanas hasta un DP de 5 y 4 respectivamente, mientras que IsIA5 sólo acumula productos con un DP de 3 (blastotriosa y levanotriosa). Lo anterior sugiere que eliminar la región N₁₀₀ terminal afecta la capacidad de la enzima de elongar productos de la serie de los blastósidos y de las oligolevanas, y permite la producción de productos diferentes a esta serie. La identificación de dichos productos es necesaria para comprender cómo participa la región N₁₀₀ terminal en el perfil de productos de esta fructansacarasa.



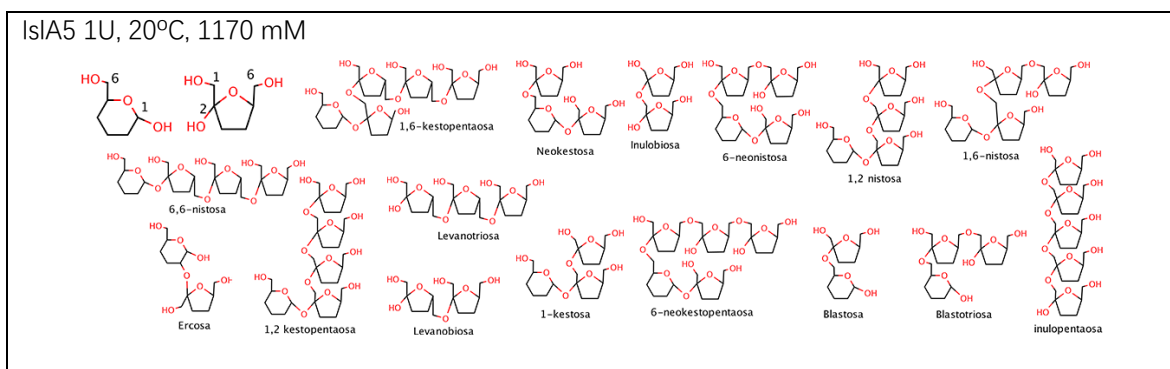


Figura 8:6 Esquematzación de los productos de reacción de IslA4 e IslA5 con 1170 mM de sustrato

Finalmente, la caracterización del perfil de productos y mecanismo de elongación de IslA5 permite concluir respecto al papel de los dominios adicionales. Los datos anteriores sugieren que los dominios adicionales no juegan un papel importante en la especificidad de enlace, pero si parecen estar implicados fuertemente en la actividad enzimática. De acuerdo con los datos reportados por García-Paz [39], las únicas versiones truncadas de IslA que contienen la región N-terminal completa (Δ NIslA2) o la región de transición (IslA3) presentan una distribución de productos bimodal, donde un polímero de bajo peso molecular y un polímero de alto peso molecular son producidos, mientras que en las versiones truncadas sin estas dos estructuras (IslA4 e IslA5) presentan una distribución de productos unimodal, es decir, únicamente producen polímero de alto peso molecular y no polímero de bajo, si no únicamente FOS. Estos resultados sugieren que la presencia de la región de transición y/o la región N-terminal completa es indispensable para la obtención de un de polímero de bajo peso molecular, mientras que la región N₁₀₀ terminal no es necesaria para la procesividad de la enzima (producción de polímero de alto), si bien es cierto que su ausencia afecta la distribución de productos de bajo peso molecular y FOS sintetizados.

9. CONCLUSIONES

1. La región N₁₀₀ terminal no es indispensable para desarrollar el mecanismo de elongación procesivo.
2. La región N₁₀₀ terminal participa en la relación de polímero de alto peso molecular y productos de bajo peso molecular sintetizados por IsIA4.
3. La región N₁₀₀ terminal es una región que no está implicada en la estabilidad de la inulosacarasa IsIA4.
4. La remoción de la región N₁₀₀ terminal afecta la actividad enzimática, probablemente a través de cambios en las constantes cinéticas.
5. Los cambios en el perfil de productos al eliminar la región N₁₀₀ terminal sugieren que dicha región influye en el acomodo del sustrato, a través de interacciones con subsitios superiores.

10. PERSPECTIVAS

Con base en los resultados presentados en este trabajo, se proponen las siguientes estrategias que complementarán los resultados sobre la influencia de los dominios adicionales en la actividad y especificidad de producto.

- Caracterización cinética de las versiones truncadas de IslA (incluyendo a IslA5).
- Construcción de una versión truncada sin la región N-terminal y con la región de transición para profundizar más en el papel de dicha región en el perfil de productos.
- Estudiar la naturaleza del polímero de las versiones truncadas para determinar si los dominios adicionales tienen influencia sobre el porcentaje de inulina/ levana y ramificación de este.
- Estudio de reacciones de aceptor de las diferentes versiones truncadas para conocer si la presencia de dominios adicionales influye en estas.
- Estudio de diversas condiciones de reacción (presencia de solventes, fuerza iónica, concentración de enzima y estado físico de la enzima) y su influencia en el perfil de productos de IslA y sus versiones truncadas.
- Estudio de la influencia de subsitios superiores en el perfil de productos, mecanismo de elongación y porcentaje de ramificación del polímero sintetizado

11. BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. Banguela and L. Hernández, "Fructans: From natural sources to transgenic plants," *Biotechnol. Appl.*, vol. 23, no. 3, pp. 202–210, 2006.
- [2] M. Shoaib *et al.*, "Inulin: Properties, health benefits and food applications," *Carbohydr. Polym.*, vol. 147, pp. 444–454, 2016, doi: 10.1016/j.carbpol.2016.04.020.
- [3] D. Ni, Y. Zhu, W. Xu, Y. Bai, T. Zhang, and W. Mu, "Biosynthesis of inulin from sucrose using inulosucrase from *Lactobacillus gasseri* DSM 20604," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 109, pp. 1209–1218, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.11.120.
- [4] V. Olivares-Illana, A. López-Munguía, and C. Olvera, "Molecular characterization of inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: A fructosyltransferase within a glucosyltransferase," *J. Bacteriol.*, vol. 185, no. 12, pp. 3606–3612, 2003, doi: 10.1128/JB.185.12.3606-3612.2003.
- [5] L. K. Ozimek, S. Kralj, T. Kaper, M. J. E. C. Van Der Maarel, and L. Dijkhuizen, "Single amino acid residue changes in subsite - 1 of inulosucrase from *Lactobacillus reuteri* 121 strongly influence the size of products synthesized," *FEBS J.*, vol. 273, no. 17, pp. 4104–4113, 2006, doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05411.x.
- [6] A. G. Heyer, B. Schroeer, S. Radosta, D. Wolff, S. Czaplá, and J. Springer, "Structure of the enzymatically synthesized fructan inulin," *Carbohydr. Res.*, vol. 313, no. 3–4, pp. 165–174, 1998, doi: 10.1016/S0008-6215(98)00281-X.
- [7] S. A. F. T. Van Hijum, G. H. Van Geel-Schutten, H. Rahaoui, M. J. E. C. Van der Maarel, and L. Dijkhuizen, "Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 68, no. 9, pp. 4390–4398, 2002, doi: 10.1128/AEM.68.9.4390-4398.2002.
- [8] T. Wada, M. Ohguchi, and Y. Iwai, "A Novel Enzyme of *Bacillus* sp. 217C-11 That Produces Inulin from Sucrose," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 67, no. 6, pp. 1327–1334, 2003.
- [9] L. K. Ozimek, S. Kralj, M. J. E. C. van der Maarel, and L. Dijkhuizen, "The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyse processive and non-processive transglycosylation reactions," *Microbiology*, vol. 152, no. 4, pp. 1187–1196, 2006, doi: 10.1099/mic.0.28484-0.
- [10] H. J. Frasch, S. S. van Leeuwen, and L. Dijkhuizen, "Molecular and biochemical characteristics of the inulosucrase HugO from *Streptomyces viridochromogenes* DSM40736 (Tü494)," *Microbiol. (United Kingdom)*, vol. 163, no. 7, pp. 1030–1041, 2017, doi: 10.1099/mic.0.000493.
- [11] T. Pijning *et al.*, "Crystal structure of inulosucrase from *Lactobacillus*: Insights into the substrate specificity and product specificity of GH68 fructansucrases," *J. Mol. Biol.*, vol. 412, no. 1, pp. 80–93, 2011, doi: 10.1016/j.jmb.2011.07.031.
- [12] E. Raga-Carbajal, E. Carrillo-Nava, M. Costas, J. Porras-Dominguez, A. López-Munguía, and C. Olvera, "Size product modulation by enzyme concentration reveals two distinct levan elongation mechanisms in *Bacillus subtilis* levansucrase," *Glycobiology*, vol. 26, no. 4, pp. 377–385, 2016, doi: 10.1093/glycob/cwv112.
- [13] M. E. Rodríguez-Alegría, A. Enciso-Rodríguez, M. E. Ortiz-Soto, J. Cassani, C. Olvera, and A. L. Munguía, "Fructooligosaccharide production by a truncated *Leuconostoc citreum* inulosucrase mutant," *Biocatal. Biotransformation*, vol. 28, no. 1, pp. 51–59, 2010, doi: 10.3109/10242420903388819.
- [14] C. P. Strube, A. Homann, M. Gamer, D. Jahn, J. Seibel, and D. W. Heinz,

- “Polysaccharide synthesis of the levansucrase SacB from *Bacillus megaterium* is controlled by distinct surface motifs,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 20, pp. 17593–17600, 2011, doi: 10.1074/jbc.M110.203166.
- [15] G. Davies and B. Henrissat, “Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases,” *Structure*, vol. 3, no. 9, pp. 853–859, 1995, doi: 10.1016/S0969-2126(01)00220-9.
- [16] E. Raga-Carbajal, E. Carrillo-Nava, M. Costas, J. Porrás-Domínguez, A. López-Munguía, and C. Olvera, “Size product modulation by enzyme concentration reveals two distinct levan elongation mechanisms in *Bacillus subtilis* levansucrase,” *Glycobiology*, vol. 26, no. 4, pp. 377–385, 2016, doi: 10.1093/glycob/cwv112.
- [17] M. E. Ortiz-Soto, C. Possiel, J. Görl, A. Vogel, R. Schmiedel, and J. Seibel, “Impaired coordination of nucleophile and increased hydrophobicity in the +1 subsite shift levansucrase activity towards transfructosylation,” *Glycobiology*, vol. 27, no. 8, pp. 755–765, 2017, doi: 10.1093/glycob/cwx050.
- [18] M. E. Ortiz-Soto, J. R. Porrás-Domínguez, J. Seibel, and A. L. M. López-Munguía, “A close look at the structural features and reaction conditions that modulate the synthesis of low and high molecular weight fructans by levansucrases,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 219, no. January, pp. 130–142, 2019, doi: 10.1016/j.carbpol.2019.05.014.
- [19] W. Lammens, K. Le Roy, L. Schroeven, A. Van Laere, A. Rabijns, and W. Van Den Ende, “Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: Functional implications,” *J. Exp. Bot.*, vol. 60, no. 3, pp. 727–740, 2009, doi: 10.1093/jxb/ern333.
- [20] S. A. F. T. van Hijum, S. Kralj, L. K. Ozimek, L. Dijkhuizen, and I. G. H. van Geel-Schutten, “Structure-Function Relationships of Glucansucrase and Fructansucrase Enzymes from Lactic Acid Bacteria,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 70, no. 1, pp. 157–176, 2006, doi: 10.1128/mmbr.70.1.157-176.2006.
- [21] S. Morales-Arrieta, M. E. Rodríguez, L. Segovia, A. López-Munguía, and C. Olvera-Carranza, “Identification and functional characterization of levS, a gene encoding for a levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F,” *Gene*, vol. 376, no. 1–2, pp. 59–67, 2006, doi: 10.1016/j.gene.2006.02.007.
- [22] S. Del Moral, C. Olvera, M. E. Rodríguez, and A. L. Munguía, “Functional role of the additional domains in inulosucrase (IsIA) from *Leuconostoc citreum* CW28,” *BMC Biochem.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–10, 2008, doi: 10.1186/1471-2091-9-6.
- [23] L. Braun, S. Dramsi, P. Dehoux, H. Bierne, G. Lindahl, and P. Cossart, “InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association,” *Mol. Microbiol.*, vol. 25, no. 02, pp. 285–294, 1997, doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.4621825.x.
- [24] A. Hill, L. Chen, A. Mariage, J. L. Petit, V. De Berardinis, and S. Karboune, “Discovery of new levansucrase enzymes with interesting properties and improved catalytic activity to produce levan and fructooligosaccharides,” *Catal. Sci. Technol.*, vol. 9, no. 11, pp. 2931–2944, 2019, doi: 10.1039/c9cy00135b.
- [25] S. Kralj, C. Leeflang, E. I. Sierra, B. Kempinski, V. Alkan, and M. Kolkman, “Synthesis of fructooligosaccharides (FosA) and inulin (InuO) by GH68 fructosyltransferases from *Bacillus agaradhaerens* strain WDG185,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 179, no. July 2017, pp. 350–359, 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.09.069.
- [26] V. Olivares-Illana, “Estudio de la inulosacarasa de la cepa CW28 de *Leuconostoc citreum* y del gen que la codifica,” Universidad Nacional Autónoma de México, 2003.
- [27] S. A. F. T. Van Hijum, K. Bonting, M. J. E. C. Van Der Maarel, and L. Dijkhuizen, “Purification of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 and characterization of the levan produced,” *FEMS*

- Microbiol. Lett.*, vol. 205, no. 2, pp. 323–328, 2001, doi: 10.1016/S0378-1097(01)00490-6.
- [28] K. G. Rosell and D. Birkhed, “An inulin-like fructan produced by *Streptococcus mutans*, strain JC2.,” *Acta chemica Scandinavica. Series B: Organic chemistry and biochemistry*, vol. 28, no. 5, p. 589, 1974, doi: 10.3891/acta.chem.scand.28b-0589.
- [29] S. A. F. T. Van Hijum, M. J. E. C. Van Der Maarel, and L. Dijkhuizen, “Kinetic properties of an inulosucrase from *Lactobacillus reuteri* 121,” *FEBS Lett.*, vol. 534, no. 1–3, pp. 207–210, 2003, doi: 10.1016/S0014-5793(02)03841-3.
- [30] C. Schwab, J. Walter, G. W. Tannock, R. F. Vogel, and M. G. Gänzle, “Sucrose utilization and impact of sucrose on glycosyltransferase expression in *Lactobacillus reuteri*,” *Syst. Appl. Microbiol.*, vol. 30, no. 6, pp. 433–443, 2007, doi: 10.1016/j.syapm.2007.03.007.
- [31] M. A. Anwar, S. Kralj, M. J. E. C. Van Der Maarel, and L. Dijkhuizen, “The probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 produces high-molecular-mass inulin from sucrose by using an inulosucrase enzyme,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, no. 11, pp. 3426–3433, 2008, doi: 10.1128/AEM.00377-08.
- [32] M. A. Anwar, S. Kralj, A. V. Piqué, H. Leemhuis, M. J. E. C. Van Der Maarel, and L. Dijkhuizen, “Inulin and levan synthesis by probiotic *Lactobacillus gasseri* strains: Characterization of three novel fructansucrase enzymes and their fructan products,” *Microbiology*, vol. 156, no. 4, pp. 1264–1274, 2010, doi: 10.1099/mic.0.036616-0.
- [33] C. Olvera, S. Centeno-Leija, P. Ruiz-Leyva, and A. López-Munguía, “Design of chimeric levansucrases with improved Transglycosylation activity,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 78, no. 6, pp. 1820–1825, 2012, doi: 10.1128/AEM.07222-11.
- [34] T. Pijning, A. Vujičić-Žagar, S. Kralj, L. Dijkhuizen, and B. W. Dijkstra, “Structure of the α -1,6/ α -1,4-specific glucansucrase GTFA from *Lactobacillus reuteri* 121,” *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, vol. 68, no. 12, pp. 1448–1454, 2012, doi: 10.1107/S1744309112044168.
- [35] A. Vujičić-Žagar *et al.*, “Crystal structure of a 117 kDa glucansucrase fragment provides insight into evolution and product specificity of GH70 enzymes,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 50, pp. 21406–21411, 2010, doi: 10.1073/pnas.1007531107.
- [36] X. Meng, J. Gangoiti, Y. Bai, T. Pijning, S. S. Van Leeuwen, and L. Dijkhuizen, “Structure–function relationships of family GH70 glucansucrase and 4,6- α -glucanotransferase enzymes, and their evolutionary relationships with family GH13 enzymes,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 73, no. 14, pp. 2681–2706, 2016, doi: 10.1007/s00018-016-2245-7.
- [37] X. Meng, J. M. Dobruchowska, T. Pijning, G. J. Gerwig, J. P. Kamerling, and L. Dijkhuizen, “Truncation of domain V of the multidomain glucansucrase GTF180 of *Lactobacillus reuteri* 180 heavily impairs its polysaccharide-synthesizing ability,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 99, no. 14, pp. 5885–5894, 2015, doi: 10.1007/s00253-014-6361-8.
- [38] M. Claverie *et al.*, “Investigations on the determinants responsible for low molar mass dextran formation by DSR-M dextransucrase,” *ACS Catal.*, vol. 7, no. 10, pp. 7106–7119, 2017, doi: 10.1021/acscatal.7b02182.
- [39] F. de M. García Paz, “Estudio de la relación estructural/ función de las fructosiltransferasas multidominio,” Universidad Nacional Autónoma de México, 2020.
- [40] S. Martínez Bahena, “Delimitando la región N-terminal involucrada en la procesividad de la levansacarasa LevS de *Leuconostoc mesenteroides*,” Universidad Nacional Autónoma de México, 2020.
- [41] M. E. Ortiz-Soto, V. Olivares-Illana, and A. López-Munguía, “Biochemical properties of inulosucrase from *Leuconostoc citreum* CW28 used for inulin synthesis,” *Biocatal.*

- Biotransformation*, vol. 22, no. 4, pp. 275–281, 2004, doi: 10.1080/10242420400014251.
- [42] M. M. Bradford, “A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding,” *Anal. Biochem.*, vol. 72, pp. 248–254, 1976, doi: 10.1006/abio.1976.9999.
- [43] P. E. Reid and C. F. . Culling, “The PERiodate Oxidation of Carbohydrates in Relation to the PAS Reaction,” *J. Histotechnol.*, vol. 3, no. 3, pp. 82–90, 1980, doi: <https://doi.org/10.1179/his.1980.3.3.82>.
- [44] J. H. Robins, G. D. Abrams, and J. A. Pincock, “The structure of Schiff reagent aldehyde adducts and the mechanism of the Schiff reaction as determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy,” *Can. J. Chem.*, vol. 58, no. 4, pp. 339–347, 1980, doi: 10.1139/v80-055.
- [45] F. V. L. Portillo, “Identificación de residuos o regiones involucrados en la especificidad del producto de las fructosiltransferasas,” Universidad Nacional Autónoma de México, 2015.
- [46] T. Charoenwongpaiboon *et al.*, “Modulation of fructooligosaccharide chain length and insight into the product binding motif of *Lactobacillus reuteri* 121 inulosucrase,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 209, no. December 2018, pp. 111–121, 2019, doi: 10.1016/j.carbpol.2018.12.078.
- [47] A. Peña-Cardena, M. E. Rodri-guez-Alegri-a, C. Olvera, and A. L. Mungui-a, “Synthesis of Fructooligosaccharides by IslA4, a truncated inulosucrase from *Leuconostoc citreum*,” *BMC Biotechnol.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–9, 2015, doi: 10.1186/s12896-015-0116-1.
- [48] L. Méndez-Lorenzo *et al.*, “Intrinsic levansucrase activity of *Bacillus subtilis* 168 levansucrase (SacB),” *PLoS One*, vol. 10, no. 11, pp. 1–15, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0143394.
- [49] A. Peña-Cardena, “Obtención de fructooligosacáridos a partir de sacarosa con la inulosacarasa IslA de *Leuconostoc citreum*,” 2013.
- [50] Q. Liu, S. Yu, T. Zhang, B. Jiang, and W. Mu, “Efficient biosynthesis of levan from sucrose by a novel levansucrase from *Brenneria goodwinii*,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 157, pp. 1732–1740, 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2016.11.057.
- [51] E. Gasteiger *et al.*, “The Proteomics Protocols Handbook,” *Proteomics Protoc. Handb.*, pp. 571–608, 2005, doi: 10.1385/1592598900.
- [52] H.-X. Zhou and X. Pang, “Electrostatic Interactions in Protein Structure, Folding, Binding and Condensation,” *Chem Rev.*, vol. 118, no. 4, pp. 1691–1741, 2018, doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00305.
- [53] N. Zhao, B. Pang, C. R. Shyu, and D. Korkin, “Charged residues at protein interaction interfaces: Unexpected conservation and orchestrated divergence,” *Protein Sci.*, vol. 20, no. 7, pp. 1275–1284, 2011, doi: 10.1002/pro.655.
- [54] S. Roy, D. Martinez, H. Platero, T. Lane, and M. Werner-Washburne, “Exploiting amino acid composition for predicting protein-protein interactions,” *PLoS One*, vol. 4, no. 11, 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0007813.
- [55] R. M. Daniel, M. J. Danson, R. E. Eisinger, C. K. Lee, and M. E. Peterson, “The effect of temperature on enzyme activity: new insights and their implications,” *Extremophiles*, vol. 12, no. 1, pp. 51–59, Jan. 2008, doi: 10.1007/s00792-007-0089-7.
- [56] S. T. Del Moral-Ventura, “Función de las regiones adicionales de la inulosacarasa (IslA) de *Leuconostoc citreum* CW28,” Universidad Nacional Autónoma de México, 2008.
- [57] L. Ge *et al.*, “B-factor-saturation mutagenesis as a strategy to increase the thermostability of α -L-rhamnosidase from *Aspergillus terreus*,” *J. Biotechnol.*, vol. 275, no. March, pp. 17–23, 2018, doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.03.013.
- [58] W. Xu, J. Peng, W. Zhang, T. Zhang, C. Guang, and W. Mu, “Enhancement of the *Brenneria* sp. levansucrase thermostability by site-directed

- mutagenesis at Glu404 located at the '-TEAP-' residue motif," *J. Biotechnol.*, vol. 290, no. September 2018, pp. 1–9, 2019, doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.11.021.
- [59] E. Raga-Carbajal, A. López-Munguía, L. Alvarez, and C. Olvera, "Understanding the transfer reaction network behind the non-processive synthesis of low molecular weight levan catalyzed by *Bacillus subtilis* levansucrase," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–10, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-32872-7.
- [60] R. M. Daniel and M. J. Danson, "A new understanding of how temperature affects the catalytic activity of enzymes," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 35, no. 10, pp. 584–591, 2010, doi: 10.1016/j.tibs.2010.05.001.
- [61] R. Kashyap, T. Palai, and P. K. Bhattacharya, "Kinetics and model development for enzymatic synthesis of fructo-oligosaccharides using fructosyltransferase," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 38, no. 12, pp. 2417–2426, 2015, doi: 10.1007/s00449-015-1478-4.

12. ANEXOS

12.1 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE ISIA4

En 2013 se reportó la optimización de la expresión de IsIA4, así como la determinación de la actividad específica, porcentaje de hidrólisis/ transferencia y perfil de productos (34) a condiciones estándar de reacción (1 U de enzima, 30°C, 292 mM de sustrato, pH 6.0). Con el objetivo de realizar la caracterización de IsIA4, la enzima fue expresada y purificada por cromatografía de intercambio iónico con un gradiente de fosfatos a pH 6.0, y se analizó mediante un gel desnaturizante de proteínas para verificar la pureza de esta. En la Figura 12:1A se observa el cromatograma de purificación, donde una única señal (en azul) señala la elución de la enzima. La proteína fue purificada exitosamente (Figura 12:1C, carril E).

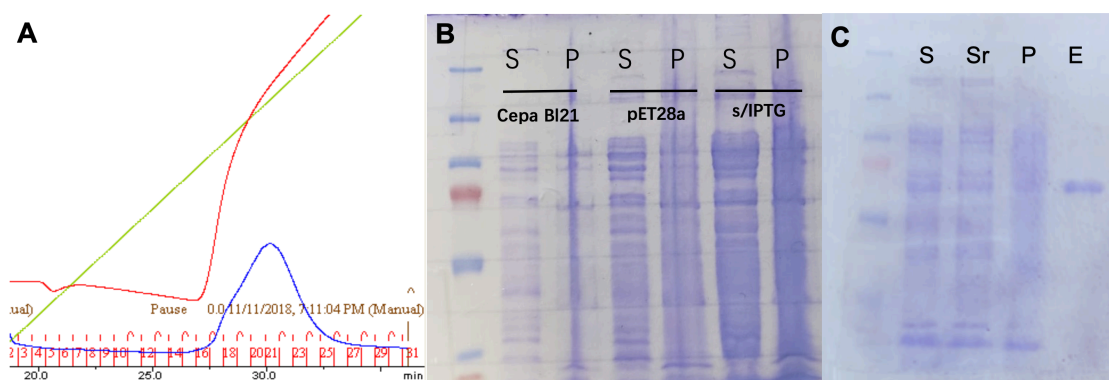


Figura 12:1 Purificación de IsIA4 **A)** Controles de expresión. **B)** Fracciones del proceso de purificación y enzima pura (4). **C)** Cromatografía de purificación de IsIA4 por cromatografía de intercambio iónico. **S:** fracción soluble, **P:** fracción insoluble, **Sr:** sobrenadante residual, **E:** enzima pura

12.2 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE ISLA5

12.2.1 OPTIMIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ISLA5

Para llevar a cabo la caracterización de la versión truncada IsIA5, fue necesaria la optimización de la expresión enzimática. Se realizaron fermentaciones con diferentes concentraciones de inductor (IPTG: 0.1 mM, 0.2 mM, 0.5 mM y 1 mM), con el objetivo de encontrar las mejores condiciones de inducción. Las células cosechadas de estas fermentaciones fueron lisadas y las proteínas presentes en el extracto celular fueron analizadas a través de geles desnaturante SDS-PAGE para comprobar la sobreexpresión de la enzima. En la Figura 12:2A y B se presentan las proteínas obtenidas de la fracción soluble (S) e insoluble (o pellet, P) de las fermentaciones a diferentes concentraciones de IPTG y los controles correspondientes.

De acuerdo con la imagen, parece no haber presencia de enzima en la fracción soluble en el tamaño estimado de IsIA5, que es de 56 kDa (Figura 12:2, carriles con inductor), pero en la fracción insoluble se puede observar la presencia de una banda la cual corresponde al tamaño esperado (señalada con un rectángulo). Cabe mencionar que no se aprecia diferencia en la sobre expresión de la enzima a diferentes concentraciones de inductor. Para corroborar el resultado anterior, se realizó un análisis de imagen por calibración de intensidad de color demostrando que las bandas tienen una similitud del 96% (o una diferencia del 4%), lo que indica que no existe diferencia en la expresión de la enzima al variar la concentración de inductor.

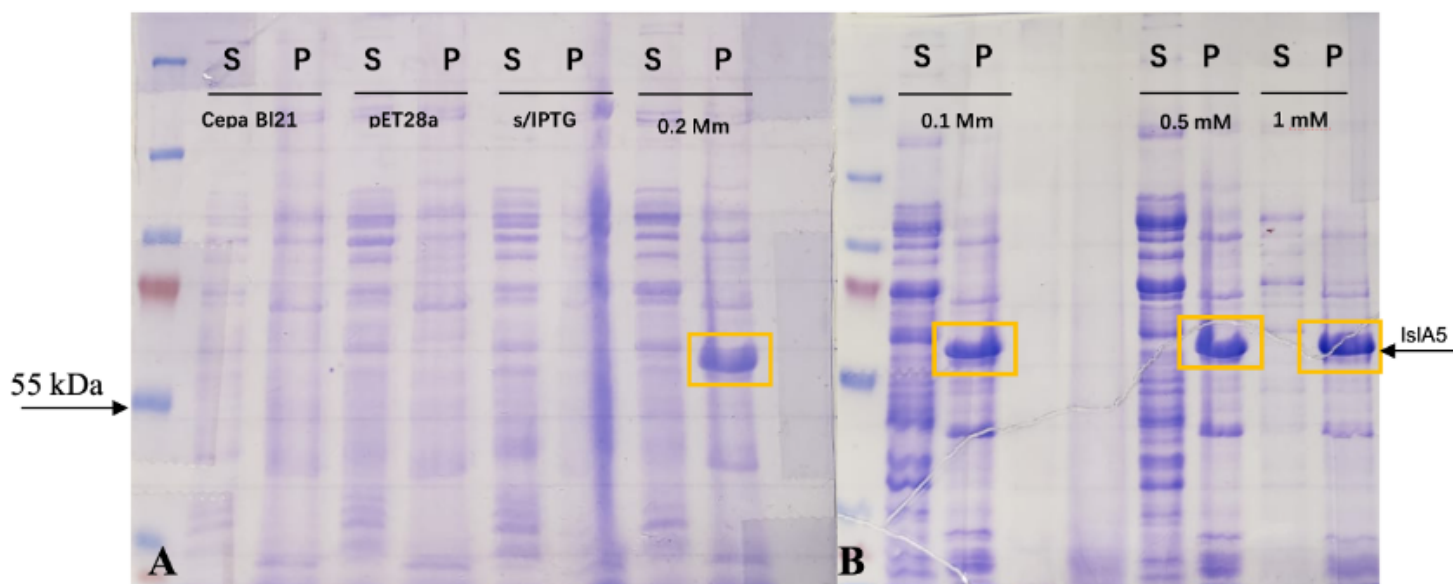


Figura 12:2 Optimización de la expresión de *IsIA5*. **A)** Controles de la cepa utilizada, del vector y la fermentación sin inductor. **B)** Sobre expresión de *IsIA5* a diferentes concentraciones de inductor. **S** sobrenadante, **P** fracción insoluble. Se cargó el volumen equivalente a 25 μ g de proteína por carril

A partir de este ensayo, se determinó utilizar una concentración de 0.5 mM de IPTG para la sobre expresión de *IsIA5*. Un zimograma de las fracciones soluble e insoluble de una fermentación posterior demostraron la presencia de enzima en la fracción soluble (Figura 12:3A, carriles S1-S3), por lo que se determinó la actividad volumétrica y unidades totales de estas fracciones. La actividad enzimática se evaluó por el método de detección de azúcares reductores con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), a 30°C.

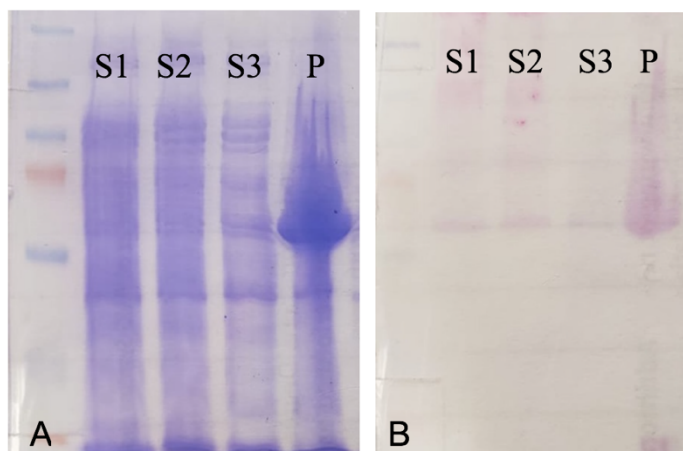


Figura 12:3 Zimograma de las fracciones soluble e insoluble de IslA5 **A)** Gel desnaturante de proteínas. **B)** Zimograma revelado con reactivo de Schiff. **S** sobrenadante, **P** paquete celular lisado

En la Tabla 12:1 se resume la información de la actividad enzimática de las fracciones soluble e insoluble. En general, la enzima presenta una muy baja actividad en comparación con IslA4, para la que se reporta una actividad específica de 97.85 U/mg (Peña-Cardena, 2013). El valor máximo de actividad específica para la enzima IslA5 soluble en extracto es de apenas el 0.02% de la actividad reportada para IslA4 a 30°C, concluyendo así que se trata de una enzima muy poco activa. Por otra parte, en la fracción soluble se obtienen apenas 2 U totales, mientras que el pellet conserva aproximadamente 5 U totales, siendo el pellet la fracción que más enzima presenta.

Tabla 12:1. Determinación de la actividad volumétrica de IslA5 de la fracción soluble e insoluble. Determinación en buffer de trabajo, a 30°C y 292 mM de sustrato.

	Actividad volumétrica (U/mL)	Unidades totales (U)
S	0.135 ± 0.0045	2.025 ± 0.0675
P	0.355 ± 0.0251	5.3220.3772

12.2.2 PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA ISIA5

Una vez demostrado que la enzima IsIA5, sí se sobre expresa y se encuentra tanto en la fracción soluble (en menor cantidad) como en la fracción insoluble, se implementaron dos métodos de purificación: uno a partir de la fracción insoluble (purificando cuerpos de inclusión y desplegando y replegando la enzima) y otro empleando la fracción soluble a través de cromatografía de afinidad a níquel. La finalidad de esta estrategia fue la de seleccionar el método más adecuado para una mayor recuperación de enzima soluble y activa.

12.2.2.1 PURIFICACIÓN DE ISIA5 DE CUERPOS DE INCLUSIÓN

La enzima que se encuentra en la fracción insoluble (pellet) fue recuperada implementando una metodología de purificación de cuerpos de inclusión. En esta metodología, el paquete celular de una fermentación de 1 L es lisado, mediante sonicación y ciclos de congelamiento/ descongelamiento. Posteriormente, el pellet es lavado empleando el reactivo Bugbuster® como se describe en materiales y

métodos.

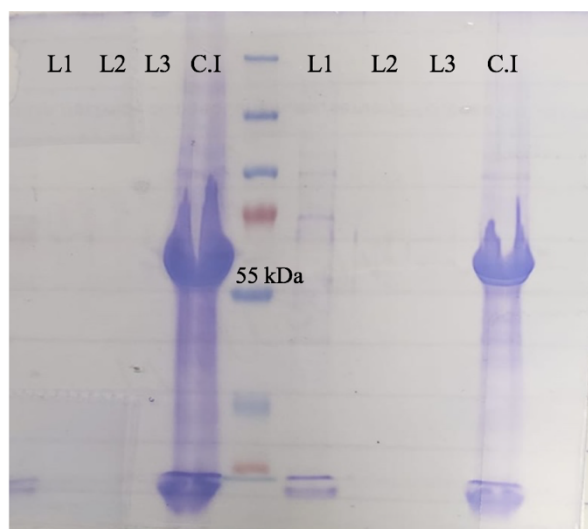


Figura 12:4 Proceso de purificación de cuerpos de inclusión (C.I) recuperados de un pellet lisado de IsIA5. L lavados realizados a los C.I

Un gel desnaturizante de proteínas permitió verificar la efectividad del método de purificación de cuerpos de inclusión, ya que después de los lavados, se logró obtener una banda enriquecida aproximadamente a 56 kDa, que concuerda con el peso molecular de IsIA5. Por lo tanto, se puede afirmar que una gran parte de la fracción de los cuerpos de inclusión esta conformada por la proteína de interés (Figura 12:4).

Adicionalmente, se demostró a través de un zimograma que los cuerpos de inclusión presentan actividad, esto puede deberse a que existen moléculas de enzima adecuadamente plegada formando parte de los cuerpos de inclusión capaces de producir polímero (Figura 12:5).

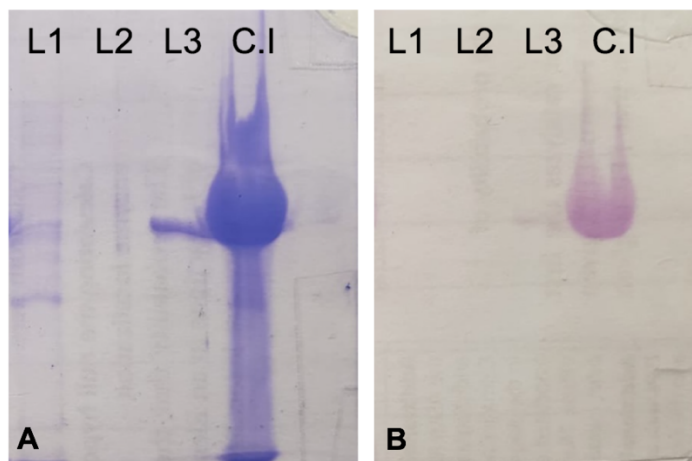


Figura 12:5 Zimograma de los cuerpos de inclusión (C.I) de IsIA5A) Gel desnaturalizante de proteínas, teñido con azul de Coomassie. B) Zimograma del gel A, revelado con reactivo de Schiff

12.2.2.1.1 RENATURALIZACIÓN DE ENZIMA DE LA FRACCIÓN INSOLUBLE

Una vez que se obtuvieron los cuerpos de inclusión purificados, se realizó la renaturalización de la proteína mediante el método de dilución por goteo a una tasa de 0.005 ml/min en buffer de renaturalización (buffer de acetatos 0.05 M, CaCl_2 1 mM y arginina 0.2 M, pH 6.0), a 4°C), con agitación suave. Posteriormente, la enzima renaturalizada fue concentrada a un volumen final entre 1 y 5 mL.

Una vez concentrada la enzima, se comprobó que esta fuera activa a través de un zimograma (Figura 12:6B), cargando diferentes volúmenes de enzima. El gel desnaturalizante permitió corroborar la pureza de la enzima y la ausencia de proteólisis al momento de su recuperación (Figura 12:6A).

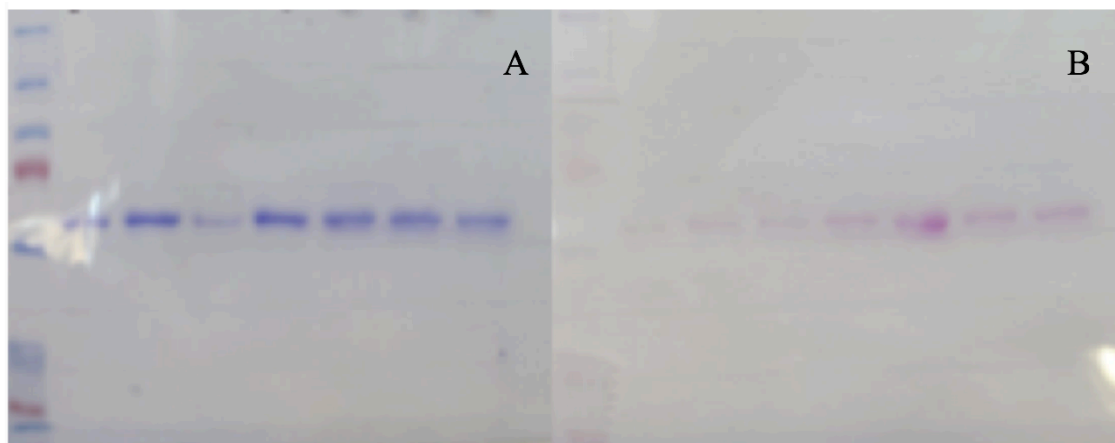


Figura 12:6 Gel desnaturalizante de proteínas **(A)** y zimograma **(B)** de IslA5 renaturalizada.

Adicionalmente, se determinó la actividad específica de esta enzima, encontrando un valor de 0.7 U/mg, que al comparar con la actividad específica de IslA4 (97.85 U/mg, Peña-Cardena, 2013), se puede concluir que la enzima es muy poco activa, y que con este método de purificación se recuperan a penas 1.1 U totales en un litro de fermentación. Cabe destacar, que la enzima una vez purificada y almacenada por menos de 12 h a 4°C se precipita, afectando fuertemente la actividad enzimática. Por esta razón este método de purificación fue descartado.

12.2.2.2 PURIFICACIÓN DE ENZIMA DE LA FRACCIÓN SOLUBLE

La enzima que se encontraba en la fracción soluble y que resulta de la lisis de las células obtenidas de una fermentación, fue purificada mediante la técnica de cromatografía de afinidad. El ensayo se llevó a cabo empleando un gradiente de imidazol de 10 a 500 mM a pH 6.5. En la Figura 12:7B se muestra el cromatograma de purificación, el cual presenta dos señales principales. Para identificar cual de las señales corresponde a la elución de la enzima, se realizó un gel desnaturalizante de proteínas. De acuerdo con la Figura 12:7A, la enzima eluye entre las fracciones 24 a 27, correspondientes al segundo pico presente en el cromatograma. Un gel desnaturalizante de proteínas corroboró esta observación, y permitió identificar que

la enzima se obtiene con una pureza mayor al 90% (Figura 12:7A). La banda observada en aproximadamente 56 kDa permite concluir que se trata de IslA5.

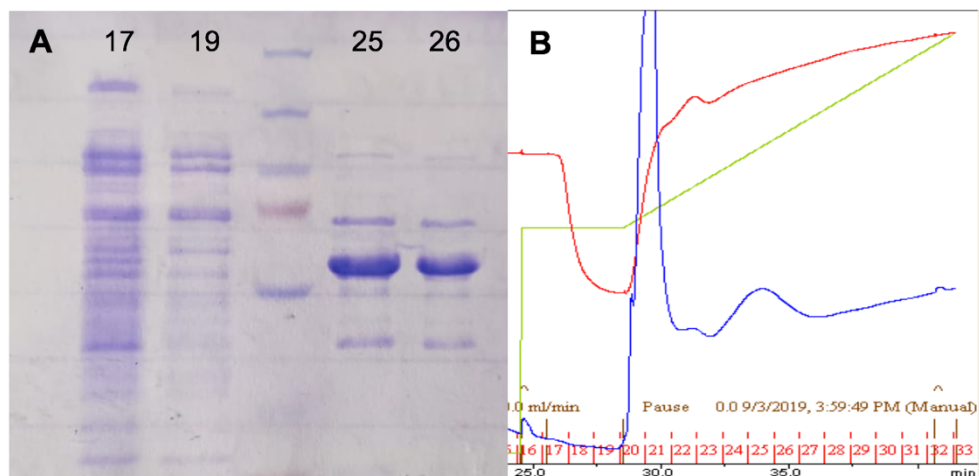


Figura 12:7 Gel desnaturante de proteínas (A) y cromatograma de purificación por cromatografía de afinidad (B). Los números en el gel desnaturante corresponden a las fracciones colectadas del proceso de purificación.

En la Tabla 12:2 se comparan los valores de actividad enzimática de los métodos de purificación. Como se puede observar, cuando la enzima proveniente de la fracción insoluble (cuerpos de inclusión) es purificada, alcanza una actividad específica de hasta 0.7 U/mg y 1.1 U totales por litro de fermentación. La cantidad de unidades enzimáticas recuperadas de la fracción insoluble es un 45% mayor al de las unidades recuperadas de la fracción soluble, pues de esta última sólo se recuperan. 0.13 U totales por litro de fermentación.

Tabla 12:2. Actividad enzimática de IsIA5 pura a 30°C y 292 mM de sustrato, obtenida por diferentes métodos de purificación

	IsIA5 soluble (cromatografía de afinidad)	IsIA5 replegada
Actividad específica (U/mg)	0.383 ± 0.0522	0.696 ± 0.0313
Unidades totales (U)	0.129 ± 0.0063	1.111 ± 0.0500

En general, los métodos implementados permiten la obtención de enzima, tanto de la fracción insoluble como de la fracción soluble. El método de purificación por cuerpos de inclusión permite obtener hasta 1.5 mg/mL de proteína; cuando ésta es replegada conserva su actividad enzimática y la enzima se obtiene completamente pura. No obstante, como ya se mencionó, esta enzima se precipita incluso almacenada a 4°C. Por esta razón se seleccionó el método de cromatografía por afinidad como el más adecuado para la purificación de IsIA5, pues a pesar de que se recupera una cantidad menor de unidades, la enzima purificada por este método no presenta el fenómeno de precipitación y la consecuente pérdida de la actividad observada con la enzima replegada.

12.3 TABLA DEL PORCENTAJE DE PRODUCTOS DE ALTO Y BAJO PESO MOLECULAR SINTETIZADO POR LAS VERSIONES TRUNCADAS A DIFERENTES CONDICIONES DE REACCIÓN

	% conversion	% hidrolisis	% alto peso molecular	% bajo peso molecular
IsIA4				
30°C 292 mM	89 ± 0.23	61 ± 0.58	25.6 ± 1.47	13.4 ± 0.06
20°C 292 mM	91 ± 0.04	47 ± 0.05	18.9 ± 1.56	34.1 ± 1.98
20°C 1170 mM	63 ± 0.31	45 ± 0.26	31.1 ± 2.02	23.9 ± 0.03
IsIA5				
20°C 292 mM	65 ± 0.27	62 ± 0.18	18.5 ± 2.02	19.2 ± 2.00
20°C 1170 mM	82 ± 0.63	31 ± 0.11	18.1 ± 2.31	50.9 ± 0.19

Ejemplo de cálculo.

Para IsIA4, 30°C y 292 mM de sacarosa. Se tiene un porcentaje de conversión (%C) del 89% a las 24 h, una concentración de polímero de 22.8 g/L y un porcentaje de transferencia (%T) del 39%.

- a) Convirtiendo el porcentaje de conversión de sacarosa a g/L:

$$\frac{89\%C * \frac{100g}{L}}{100\%} = \text{Sacarosa consumida} = 89 \text{ g/L}$$

- b) Se sabe que de esos 89g/L, el 39% se utilizó en la reacción de transferencia, equivalentes a 34.7g/L:

$$\frac{39\%T * \frac{89g}{L}}{100\%} = \text{Sacarosa transferida} = 34.7 \text{ g/L}$$

- c) Al total de la sacarosa transferida, se resta la concentración de polímero:

$$34.7 \frac{g}{L} - 22.8 \frac{g}{L} = \text{Concentración de sacarosa dirigida a la producción de FOS} = 11.9 \text{ g/L}$$

- d) Finalmente, se obtiene, en porcentaje, la producción de FOS y polímero de alto peso molecular:

$$\frac{11.9 \frac{g}{L} Fos * 100\%}{89 \text{ g/L}} = 13.4 \% \text{ productos de bajo peso molecular}$$

$$\frac{22.8 \frac{g}{L} Fos * 100\%}{89 \text{ g/L}} = 25.6 \% \text{ polímero de alto peso molecular}$$

12.4 ESQUEMATIZACIÓN DE LOS DIFERENTES PRODUCTOS SINTETIZADOS POR ISLA4 E ISLA5 A DIFERENTES CONDICIONES DE REACCIÓN

