



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio estructural de la inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* ISO3

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Jonathan Trapala Reyna

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Carmina Montiel Pacheco
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Martín González Andrade
Facultad de Medicina, UNAM.

Dra. Clarita Olvera Carranza
Instituto de biotecnología, UNAM

Ciudad de México. septiembre, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado

Presidente	Dr. Francisco Ruíz Terán	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Miquel Gimeno Seco	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Lilian González Segura	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig	Instituto de Química, UNAM
Secretario	Dr. Enrique García Hernández	Instituto de Química, UNAM

Comité tutor

Dra. Carmina Montiel Pacheco	Facultad de Química, UNAM
Dra. Clarita Olvera Carranza	Instituto de biotecnología, UNAM
Dr. Martín González Andrade	Facultad de Medicina, UNAM

Lugar donde se desarrolló el tema

El presente trabajo “Estudio estructural de la inulinasa de *K. marxianus* ISO3” se llevó a cabo en el laboratorio 314 del edificio E de la facultad de química en la UNAM bajo la tutela de la Dra. Carmina Montiel Pacheco.

De este trabajo se obtuvieron las siguientes publicaciones:

- Trapala J., Bustos-Jaimes I., Manzanares P., Barzana E., Montiel C., Purification and characterization of an inulinase produced by a *Kluyveromyces marxianus* strain isolated from blue agave bagasse, Protein expression and purification, 176, (2020).
- Trapala J., González-Andrade M., Olvera C., Cayetano-Cruz M., Sanz-Aparicio J., Jiménez-Ortega E., Bustos-Jaimes I., Montiel C., Relevance of aromatic and polar amino acids in the specificity of inulinase ISO3 from *Kluyveromyces marxianus*: A molecular dynamics approach with an experimental verification, International Journal of biological macromolecules, 242, (2023)

Agradecimientos

Al programa de apoyo a proyectos de investigación e innovación tecnológica (PAPIIT IN214123) y (PAPIIT IN219520) y al programa de apoyo a la investigación y posgrado (PAIP 5000-9153).

Al programa de apoyo a proyectos de investigación e innovación tecnológica (PAPIIT IN219520) por la beca otorgada para poder concluir los estudios de doctorado.

Al consejo nacional de humanidades ciencias y tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado (CVU 704217).

Al programa de apoyo a los estudios de posgrado (PAEP) y al posgrado en ciencias bioquímicas por el apoyo económico brindado para realizar una estancia de investigación en el CSIC de Madrid, España.

Al laboratorio de la Dra. Julia Sanz Aparicio en el CSIC de Madrid, España por permitirme realizar una estancia de investigación

Índice

1. Resumen	7
10. Perspectivas	68
11. Bibliografía	69
12. Anexo	73
2. Abstract.....	8
3. Introducción.....	9
4. Marco teórico.....	11
4.1. Agave	11
4.2. Fructanos.....	13
4.3. Organismos productores de inulinasas.....	14
4.4. <i>Kluyveromyces</i>	16
4.5. Inulinasas	17
5. Hipótesis.....	25
6. Objetivos.....	25
6.1. Objetivo general	25
6.2. Objetivos particulares.....	25
7. Materiales.....	26
7.1. Materiales.....	26
7.10. Ensayos enzimáticos.....	32
7.11. Ensayos de azúcares reductores.....	32
7.12. Caracterización enzimática de la inulinasa recombinante.....	33
7.13. Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad enzimática	33
7.14. Ensayos cinéticos	33
7.15. Dinámica molecular	34
7.2. Equipos.....	27
7.3. Purificación de DNA genómico de <i>K. marxianus</i>	27
7.4. Obtención de la proteína recombinante	28
7.5. Mutagénesis sitio dirigida de la inulinasa	29
7.6. Purificación de la inulinasa recombinante.....	30
7.7. Masa molecular de la enzima.....	31
7.8. Determinación de la glicosilación por tinción de Schiff.....	31
7.9. Deglicosilación	32
8. Resultados.....	37
8.1. Obtención de la inulinasa recombinante de <i>K. marxianus</i> ISO3	37
8.2. Ligado y transformación del inserto.....	37
8.3. Transformación de las células de <i>P. pastoris</i> X33 con el vector pPICZ α B-INU	42
8.4. Expresión de la proteína recombinante.....	43
8.5. Purificación y caracterización de la enzima recombinante	45
8.6. Ensayos de deglicosilación	47
8.7. Caracterización cinética de la inulinasa recombinante de <i>K. marxianus</i> ISO3	48
8.8. Dinámica molecular	52
8.8.1. Dinámica molecular de la inulinasa silvestre.....	52
8.8.2. Dinámicas moleculares de las mutantes propuestas.....	58
8.9. Construcción y análisis cinético de las mutantes.....	60
9. Conclusiones	67

Resumen

La inulinasa Inu-ISO3 de *Kluyveromyces marxianus* ISO3 es una enzima capaz de hidrolizar fructanos lineales como la inulina de achicoria, así como fructanos ramificados como la agavina. Esta enzima fue clonada y expresada en *Pichia pastoris* para estudiar el papel de residuos aromáticos y polares seleccionados en la cavidad catalítica mediante el escaneo de Alanina. Se realizaron simulaciones de dinámica molecular (MD) y análisis de cinética enzimática para estudiar las consecuencias funcionales de estas sustituciones de aminoácidos.

Se utilizó la mutagénesis sitio dirigida para construir las mutantes de la enzima después de realizar las simulaciones de MD entre Inu-ISO3 y sus sustratos. La mutación Trp79 Ala resultó en la pérdida total de actividad cuando se utilizaron fructanos como sustratos, mientras que, con sacarosa, la actividad disminuyó en un 98%. En contraste, las mutaciones Phe113 Ala y Gln236 Ala aumentaron la actividad invertasa cuando se utilizó sacarosa como sustrato. Aunque estos aminoácidos no forman parte de los motivos conservados donde se encuentra la tríada catalítica, son esenciales para la actividad de la enzima. Enfoques *in silico* y experimentales corroboran la relevancia de estos residuos para la unión del sustrato y su influencia en la actividad enzimática.

Abstract

The Inulinase from *Kluyveromyces marxianus* ISO3 (Inu-ISO3) is an enzyme able to hydrolyze linear fructans such as chicory inulin as well as branched fructans like agavin. This enzyme was cloned and expressed in *Pichia pastoris* to study the role of selected aromatic and polar residues in the catalytic pocket by Alanine scanning. Molecular dynamics (MD) simulations and enzyme kinetics analysis were performed to study the functional consequences of these amino acid substitutions. Site-directed mutagenesis was used to construct the mutants of the enzyme after carrying out the MD simulations between Inu-ISO3 and its substrates. Mutation Trp79 Ala resulted in the total loss of activity when fructans were used as substrates, while with sucrose, the activity decreased by 98 percent. In contrast, the mutations Phe113 Ala and Gln236 Ala increased the invertase activity when sucrose was used as a substrate. Although these amino acids are not part of the conserved motifs where the catalytic triad is located, they are essential for the enzyme's activity. *In silico* and experimental approaches corroborate the relevance of these residues for substrate binding and their influence on enzymatic activity.

Introducción

El agave, también conocido en México como planta del maguey, ha representado una fuente importante de fibra, medicinas tradicionales y principalmente materia prima para elaborar bebidas alcohólicas. Debido a esto, en el país se cultivan una gran cantidad de agaves de diferentes tipos siendo el *Agave tequilana* la especie que más se produce ya que a partir de esta se obtiene el tequila que tiene denominación de origen (Parsons y Darling, 2000).

Esta denominación de origen sólo permite obtener la bebida a partir de la especie *A. tequilana* weber variedad azul, dejando a los productores de otros agaves sin la posibilidad de obtener tequila a partir de estos. Esto ha generado que los agaves que no puedan ser usados para la producción de esta bebida alcohólica sean destinados como plantas ornamentales o pueden usarse como materia prima en la obtención de fibra dietética como la inulina, también conocida como agavina (Macilla-Margalli y Lopez, 2006).

La inulina de agave o agavina es un polímero compuesto de fructosa y glucosa, se le considera un fructano mixto ya que presenta enlaces β -(2-1) y β -(2-6) entre las moléculas de fructosa y además presenta moléculas internas de glucosa. Estas características de composición y tipo de enlace hacen que las inulinasas comerciales, que principalmente se han obtenido de hongos filamentosos, como *Aspergillus* sp, hidrolicen solo de manera parcial a este carbohidrato. Una alternativa a esto ha sido la búsqueda y obtención de enzimas que degraden a la agavina. Se ha reportado que las levaduras como *Kluyveromyces* sp. producen inulinasas que hidrolizan este sustrato (Gao J., *et al.*, 2015).

Por otro lado, algunas enzimas provenientes de plantas, hongos, bacterias y levaduras, que degradan fructanos han sido estudiadas a nivel estructural. Gracias a estos avances se han obtenido diferentes estructuras cristalográficas que han permitido obtener información relevante sobre su conformación. Además de estos resultados también se ha logrado identificar la posición precisa de los motivos catalíticos que se encuentran conservados en estas enzimas, por lo que se ha logrado entender la catálisis de los distintos sustratos que se han estudiado (Van den Ende, *et al.*, 2009).

Al igual que otras enzimas que degradan carbohidratos las inulinasas comparten algunos arreglos conformacionales como el barril beta que se encuentra en el dominio amino y el β sandwich presente en el dominio carboxilo. Se sabe que en el dominio amino se encuentra la región catalítica, mientras que el segundo dominio se cree que puede reconocer al carbohidrato ya que se

ha comprobado esta función en otras enzimas con la misma distribución de dominios (Nagen *et al.*, 2004).

El entendimiento de su estructura y catálisis abrió la puerta a profundizar en el estudio del reconocimiento de los distintos sustratos que es capaz de catalizar estas enzimas obteniendo información muy relevante que ha llevado a comprender el rol que juegan algunos aminoácidos cercanos al sitio catalítico (Cimini, *et al.*, 2016).

Hoy en día se sabe que los aminoácidos que son más importantes en el reconocimiento y que intervienen en la catálisis son de tipo polar y aromáticos ya que pueden formar puentes de hidrógeno e interacciones tipo π con los carbohidratos respectivamente.

Sin embargo, aún no se entiende por completo cómo se lleva a cabo el reconocimiento molecular en estas enzimas en particular las obtenidas de levaduras con sustratos sencillos como la inulina de chicoria y se vuelve mucho más complejo el tratar de dilucidar el reconocimiento con fructanos complejos como la agavina.

En el presente trabajo se planteó estudiar el reconocimiento enzima-sustrato a nivel estructural de la inulinasa de *K. marxianus* ISO3, (levadura aislada en nuestro grupo de investigación, a partir de residuos de bagazo de agave) que es capaz de hidrolizar agavina, con la finalidad de entender cómo se lleva a cabo este proceso.

Marco teórico

Agave

Estas plantas por lo general tienen hojas duras que contienen una espina terminal, sus tallos son pequeños y sirven de base para las hojas que emergen (Irish & Irish, 2000).

El agave pertenece a la familia de las Agavaceae y comprende cerca de 166 especies, estas crecen naturalmente en el norte y centro del continente americano, algunas de estas especies se han adaptado a países en otros continentes como África, Asia y Oceanía (Almaraz-Abarca, *et al.*, 2013).

México es el centro de origen del agave, cerca de 125 especies crecen desde el sur del país en estados como Yucatán, Oaxaca o Chiapas, pasando por el centro de la república en estados como, Jalisco, Querétaro, Estado de México hasta el norte en regiones como Sonora o Durango (Figura 1).



Figura 1. Distribución geográfica de producción de agaves en México. Tomado y modificado de CONABIO.2005

También se ha visto que se ve favorecido su crecimiento en climas áridos y semiáridos debido a esto México cuenta con una gran riqueza de agaves. Las distintas variedades de agave tienen diferentes características y propiedades; algunos, por ejemplo, son mejores productores de fibra, otras de savia o bien pueden crecer mejor en condiciones más severas de clima. El origen de la diversidad botánica de estas especies se sugiere que es el resultado de una selección humana antigua, con la finalidad de mejorar algunas cualidades lo que favoreció la diversidad y la especialización (Parsons y Darling, 2000).

Estas plantas representan un gran interés comercial ya que son materia prima de un gran número de industrias, siendo la principal la producción de bebidas alcohólicas, como el tequila y el mezcal (Díaz-Montaño, 2013). Además de estas industrias, se han desarrollado propuestas muy interesantes para el aprovechamiento de esta planta en industrias como la alimenticia, farmacéutica, textil y bioenergética entre otras (Nava-Cruz, *et al*, 2014). A nivel industrial la planta se divide en dos partes principalmente, la primera parte son las hojas en donde es posible extraer grandes cantidades de fibra. La segunda es la piña que generalmente se somete a cocción para posteriormente extraer un jugo que tiene una gran cantidad de carbohidratos que pueden ser usados en la fermentación.

En México la Secretaria de Agricultura reportó en 2020 que los estados de la republica que más produjeron agave fueron Jalisco con 1,146,000 toneladas seguido por Guanajuato con 273,000 toneladas y Oaxaca con 183,000 toneladas. Además de lo producido en el país se ha reportado el crecimiento del agave con fines ornamentales en países de África como Kenia y Tanzania, también en el norte de Estados Unidos de América y muy recientemente en algunas regiones de Australia.

Debido a la composición química del lugar donde se cultivan los agaves estos pueden ser ricos en carbohidratos y algunos compuestos que son fermentables y que les dan a las bebidas su sabor particular. Los carbohidratos que componen al agave en su mayoría son fructanos, que son utilizados como fuente de carbono por los microorganismos durante el proceso de fermentación (Macilla-Margalli y Lopez, 2006).

Se ha reportado que existen diferencias interesantes en la estructura de los fructanos según la agavácea de origen. Estas diferencias en la producción de fructanos se ve influenciada por factores como: la región en la que crece la planta, los nutrientes del lugar, los cambios de clima, la estación del año o la cantidad de agua. El *A. americana* por ejemplo tiene fructanos lineales mayoritariamente (Bhatia y Nandra, 1979), mientras que el *A. veracruz* y el *A. tequilana* son de otro tipo ya que contienen una mayor cantidad de ramificaciones β -(2-6) que el *A. americana* (Dorland, *et al.*, 1977) (Lopez, Mancilla-Margalli y Mendoza-Díaz, 2003).

La industria tequilera que usa grandes cantidades de *A. tequilana*, ha contribuido al desarrollo de la agricultura y la industria en México, especialmente en el estado de Jalisco. En los últimos años, el consumo y producción de tequila se ha incrementado notablemente, por ejemplo, en 2020 se produjeron 1,407,000 toneladas de agave y para 2022 se cosecharon 2,610,000 toneladas

(Consejo regulador del tequila, 2023). Esto genera una gran cantidad de residuos como el bagazo y las hojas del agave que no son necesarias en la producción de la bebida destilada y que presentan cantidades entre el 10 al 15 por ciento en base seca de fructanos que son considerables al ver el tamaño de la producción de agave (Montañez-Soto, *et al.*,2011).

Otro punto importante es la utilización de los agaves que no son usados para la fermentación del tequila debido a la denominación de origen al igual que los empleados en el mezcal o la bocanora. Esto ha generado que los productores planteen otras opciones que puedan ser viables para aprovechar estas agaváceas con la intención de aprovechar los fructanos presentes en éstas.

Fructanos

En las plantas del 12 al 15% de los carbohidratos presentes son fructanos, estos son polímeros que se encuentran formados por unidades β -fructofuranosil principalmente y en menor concentración unidades de glucosa. Estos polímeros comúnmente son solubles en agua y son sintetizados a partir de sacarosa que se acumula en vacuolas para ser usados como agentes contra la desecación (Vijin y Smeekens, 1999).

De acuerdo al tipo de unión de las unidades de fructosa se han identificado cinco tipos de fructanos: 1. Inulina; que presenta enlaces β -(2,1) en las unidades fructofuranosas, 2. Levana; cuando los enlaces predominantes son β -(2,6), 3. Las neoserias de inulina; que tienen algunas ramificaciones β -(2,6) (Figura 2) y además tienen una molécula de glucosa entre las unidades de fructosa, 4. Las neoserias de levana son un caso similar, pero en este caso las ramificaciones son β -(2,1) y 5. Los graminanos que son otro tipo de fructanos que se componen por una unidad de sacarosa con ramificaciones de fructosa con enlaces β -(2,1) y β -(2,6) y moléculas de glucosa en los extremos.

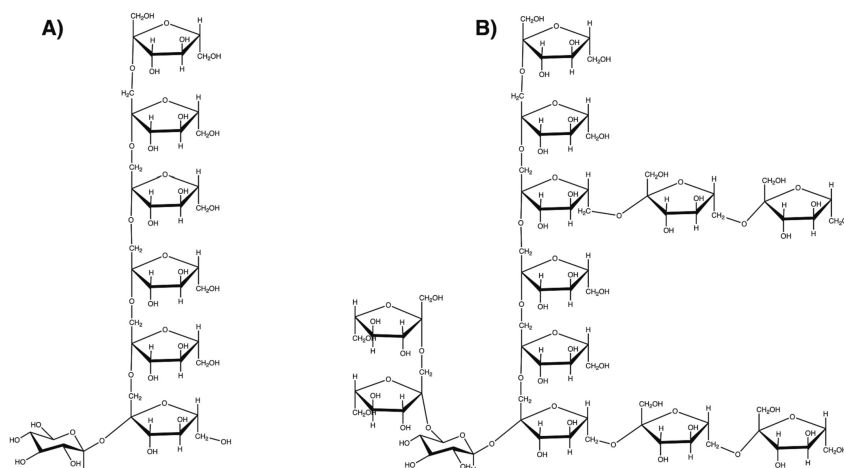


Figura 2. Estructura de los fructanos. A. Inulina, B. Agavina presente en el *A. tequilana* weber (tomado de Mancilla-Margalli y López, 2006).

Sin embargo, se ha encontrado que los fructanos presentes en el *A. tequilana* weber contienen uniones β -(2,1) y β -(2,6) con unidades internas y externas de glucosa, a este nuevo fructano se le ha denominado agavina (Mancilla-Margalli y López, 2006).

Generalmente la inulina que se usa como materia prima comercial es obtenida de la raíz de achicoria o de la alcachofa ya que son moléculas lineales con enlaces β -(2-1). Este polímero de fructosa se obtiene de estas plantas a partir de un proceso, primero de trituración y posteriormente se adiciona agua caliente para llevar a cabo la extracción de la inulina de la planta. Una vez obtenido este líquido rico en carbohidratos se agrega etanol para ir precipitando los distintos carbohidratos presentes en ellos. Ya que se obtiene el precipitado se retira el disolvente restante quedando un polvo blanco (Arango, *et al*, 2008). Los principales países productores de inulina en el mundo son Bélgica, Países bajos y Chile con cerca del 93 por ciento del mercado a nivel mundial (Traub, 2014). Estos países son los principales exportadores de esta sustancia y México es uno de los tantos países que importan este producto. Sin embargo, una opción para producir inulina dentro del país es el empleo de las distintas agaváceas que crecen en el territorio nacional (Leyva-Porras, *et al.*, 2014). A partir de la inulina se pueden obtener diferentes compuestos de alto valor agregado como los fructooligosacaridos o jarabes de alta fructosa. Los fructanos de baja masa molecular son de gran interés para diversas industrias como la alimentaria y la farmacéutica ya que se ha visto que su consumo está asociado a beneficios a la salud. Estos compuestos se pueden obtener por métodos químicos como la hidrólisis ácida, aunque tiene la desventaja de generar productos que son indeseables como los derivados de furano. Otra alternativa es el uso de enzimas que lleven a cabo la degradación de estos fructanos, en condiciones más suaves de reacción. Las enzimas que se emplean con mayor frecuencia son las levanasas al igual que las inulinasas que se obtienen de diferentes organismos.

Algunas inulinasas son capaces de usar como sustrato algunas fuentes como residuos agroindustriales o plantas como las agaváceas que son ricas en fructanos y que pueden ser una alternativa en México como materia prima. En la literatura se tienen pocos reportes sobre organismos que sean capaces de degradar a los fructanos presentes en el agave, por lo que se requiere encontrar y estudiar aquellos microorganismos que sean capaces de realizar esta función (Arrizon, *et al.*, 2011).

Organismos productores de inulinasas

En la naturaleza existen diferentes organismos productores de inulinasas como las plantas, bacterias, levaduras y hongos filamentosos. Se ha observado que las plantas productoras de inulina como la achicoria, el agave y la alcachofa son capaces de producir enzimas que degradan el polímero de fructosa. En particular se ha logrado aislar e identificar una inulinasa de la raíz de achicoria de una masa molecular cercano a los 70 kDa (Claessens, *et al.*, 1990). Estas enzimas a pesar de poder usar como sustrato inulina tienen la desventaja de no ser tan eficientes como las de origen microbiano (Kochhar, *et al.*, 1999).

Por otro lado, las enzimas aisladas de fuentes microbianas tienen una gran relevancia ya que debido a su eficiencia catalítica y a las condiciones de trabajo a las que operan son viables para ser usadas en la industria.

Los microorganismos que producen estas enzimas son bacterias, hongos filamentosos y levaduras. Las bacterias como *Staphylococcus* sp son capaces de crecer en cereales con bajas cantidades de inulina como el salvado de trigo que puede presentar del 1% al 3% m/m. Por otro lado, las bacterias gram negativas como las *Xanthomonas* sp son capaces de usar como sustrato la inulina presente en la cebolla que puede estar presente entre el 2% al 6% m/m (Chi, *et al.*, 2009).

Los organismos con mayor interés para la producción de inulinasas son los hongos filamentosos y las levaduras, ya que se ha observado que estas enzimas poseen características deseables para ser usados en procesos industriales como son la resistencia a altas temperaturas, además de su eficiencia catalítica. Los hongos filamentosos como *Aspergillus ficcum* se ha estudiado a detalle ya que es capaz de producir enzimas que degradan a la inulina y producen fructooligosacaridos. Otros hongos como *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger* o *Penicillium* sp son capaces de producir inulinasas que hidrolizan la inulina a fructosa. Estos hongos se han estudiado usando distintos medios con la finalidad de producir la enzima, estos van desde el uso de residuos agroindustriales como residuos de alcachofa, achicoria o ajo hasta la modificación de fuentes de nitrógeno y la aplicación de distintas sales (Treichel, *et al.*, 2011).

Las levaduras por su parte son capaces de producir enzimas que trabajan en un intervalo amplio de temperatura que van desde 35°C hasta 60°C como la invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* o la β -fructofuranosidasa de *Schwanniomyces occidentalis*. Por otro lado, la inulinasa producida por *K.*

marxianus es capaz de degradar inulinas más complejas como la agavina y además son secretadas al medio por lo cual su purificación resulta más sencilla. Se han reportado algunas de sus características bioquímicas como la masa molecular, pH de trabajo y temperatura óptima (Trapala, *et al.*, 2020). Por ejemplo, la inulinasa de *Kluyveromyces fragilis* tiene un peso promedio de 250 kDa y un pH óptimo entre 4.5 y 6 (Treichel, *et al.*, 2011). En la Tabla 1 se muestra la producción de inulinasa de distintas cepas de la levadura *K. marxianus* reportadas en la literatura.

Tabla 1. Producción de inulinasa en distintas cepas de *Kluyveromyces marxianus*

Cepa	U/mL	Medio de crecimiento	de referencia
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	1317	Residuos de caña de azúcar y maíz	Treichel <i>et al.</i> , 2009
<i>Kluyveromyces marxianus</i> DD4	1139	Extracto de dalia	Squarezi <i>et al.</i> , 2009
<i>Kluyveromyces marxianus</i> MTCC 188	300.5	Sacarosa, extracto de levadura, peptona	Dilipkumar <i>et al.</i> , 2013
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var <i>marxianus</i>	288	Extracto de esparrago	Dilipkumar <i>et al.</i> , 2014
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC 587	735	Bagazo de soja	Makino <i>et al.</i> , 2009

En particular *K. marxianus* presenta un gran potencial para la producción de inulinasas.

Las inulinasas pueden ser usadas en una gran cantidad de aplicaciones industriales como, por ejemplo; obtención de jarabes de alta fructosa, producción de bioetanol, y producción de FOS entre otras (Gao J., *et al.*, 2015).

Kluyveromyces

Las levaduras y en particular las *Kluyveromyces* sp. han presentado buenos rendimientos en la producción de inulinasas. Estos microorganismos además tienen la ventaja de ser reconocidos como seguros ya que cuentan con la denominación GRAS (Generally Regarded as Safe por sus siglas en inglés) de la FDA (Lane y Morrissey, 2010).

La cepa *K. marxianus*, en especial, tiene un gran número de características que son ideales para la industria ya que tiene un crecimiento rápido, amplio espectro de sustratos que pueden ser usados para que este microorganismo crezca. Además de estas características, es termo tolerante, se le considera GRAS y es capaz de secretar una cantidad considerable de enzimas como pectinasas o inulinasas (Gombert, *et al.*, 2016). Una de las ventajas más importantes es el buen crecimiento en medio cuya fuente de carbono es xilosa, galactosa o inulina. Estos sustratos pueden provenir de residuos agroindustriales que pueden ser aprovechados para la obtención de compuestos de interés para la industria (Graciano-Fonseca y Heinzle, 2008). En la literatura se ha reportado que este microorganismo es capaz de producir compuestos de alto valor comercial como son feniletanol, fenilalanina, ácido hexanoico, xilitol o enzimas de alto interés industrial como las inulinasas. *K. marxianus* es una especie de levadura aerobia que se ha encontrado en la fermentación del agave mezcalero. Esta especie ha demostrado tener una excelente capacidad de producción de inulinasas. Estas enzimas se saben, que son secretadas al medio de cultivo por lo que se ha generado gran interés (Rouwenhorst, *et al.*, 1988).

La inulina producida por esta levadura ya ha sido clonada y sobre expresada en otros organismos como *S. cerevisiae* (Seok-Hwan, *et al.*, 2010) y *Aurantiochytrium sp* (Yu, *et al.*, 2020). La actividad de la enzima recombinante ha sido determinada usando como sustratos a la inulina de chicoria y a la sacarosa, pero no ha sido probada con fructanos más complejos como las agavinas, por lo cual es necesario su estudio.

Inulinasas

El empleo de inulinasas (EC 3.2.1.80) para hidrolizar fructanos con el fin de producir fructosa, puede ser más rentable que el método tradicional en el cual se lleva a cabo la hidrólisis del almidón a glucosa y su posterior isomerización a fructosa (Singh K., y Shukla P., 2012). En un proceso industrial para producir fructosa a partir de inulina, la hidrólisis química se lleva a cabo a condiciones ácidas a una temperatura de 60°C, para prevenir contaminación microbiana e incrementar la solubilidad de la inulina. Si se tratara de implementar un proceso de hidrólisis enzimática de inulina, contar con una enzima termoestable podría jugar un papel importante en el proceso.

Las inulinasas se clasifican dentro del grupo de las fructosilhidrolasas. Estas pueden dividirse en endo- y exoinulinasas. Las endoinulinasas hidrolizan los enlaces internos de la inulina, mientras

que las exoinulinasas hidrolizan los extremos de este compuesto (Chi, *et al.*, 2009). Este grupo de enzimas pertenecen a la familia 32 de las glicosilhidrolasas (GH32). Estudios recientes han encontrado que la estructura tridimensional de estas enzimas está organizada principalmente por dos dominios. El primer dominio se encuentra en el extremo amino terminal y está constituido por cinco hojas beta que forman una β propela que está presente en esta familia de proteínas. El segundo dominio se le denomina β -sandwich, se encuentra en el extremo carboxilo terminal y está formado por dos hojas beta (Figura 3) (Cimini, *et al.*, 2016).

El sitio activo de estas proteínas se encuentra en el dominio β propela y en él están tres motivos conservados que son característicos. El primer motivo conservado es WMNDPNG, en este se encuentra un residuo de ácido aspártico que tiene la función de nucleófilo en la reacción de hidrólisis. En el segundo motivo compuesto por RDP se encuentra el ácido aspártico que sirve para estabilizar el complejo enzima-sustrato.

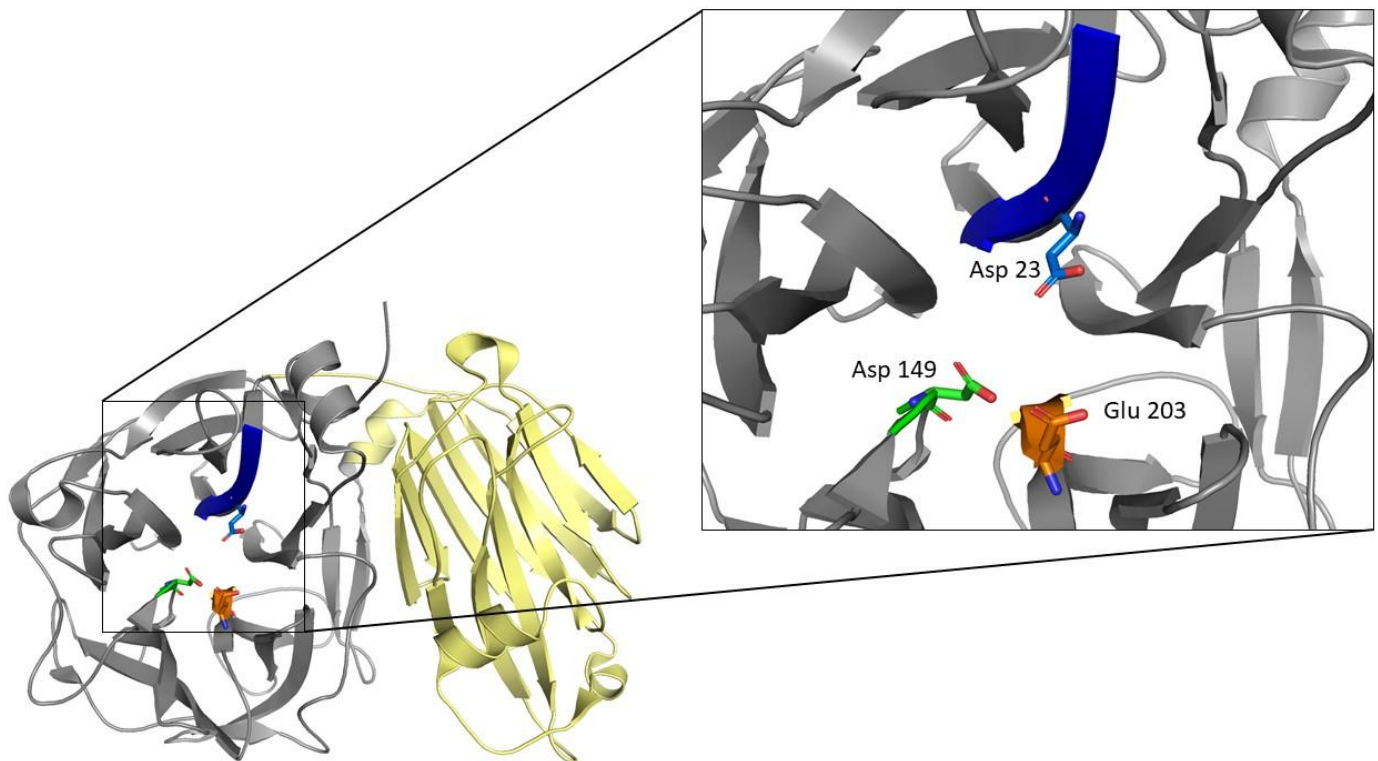


Figura 3. Estructura de una fructosilhidrolasa de la familia GH32 (Invertasa de *Arabidopsis thaliana* (PDB 2AC1). En color gris se muestra el dominio amino, en amarillo el dominio carboxilo, en azul se muestra el primer motivo, en verde el segundo y en naranja el tercero. En el acercamiento se observan los tres aminoácidos catalíticos los cuales son: el ácido aspártico 23, el 149 y el ácido glutámico 203 embebidos en los motivos conservados.

Por último, se tiene un tercer motivo constituido solo por los residuos **EC**. En él, el ácido glutámico juega un rol muy importante en la catálisis ya que es el encargado de donar protones (Figura 3) (Van den Ende, *et al.*, 2009). El mecanismo general de estas enzimas es el descrito por Nagen

quien usó como modelo la estructura de la exo inulinasa de *A. awamori* el ácido aspártico 41 presente en el primer motivo ataca al carbono 2 del anillo fructosil del carbohidrato formando un complejo, mientras que el ácido glutámico 241 dona un hidrogeno para estabilizar el grupo saliente. Después el ácido glutámico 241 usando una molécula de agua promueve el ataque al carbono 2 del anillo de fructosa liberando al ácido aspártico 41 (Nagen *et al.*, 2004) (Figura 4).

Dentro de esta familia de proteínas se ha generado la incertidumbre de cuál es la diferencia entre una fructanhidrolasa como las levanasas, las inulinasas y las invertasas ya que cualquiera de estas enzimas es capaz de hidrolizar tanto a la sacarosa como a los fructanos, pero en diferente proporción.

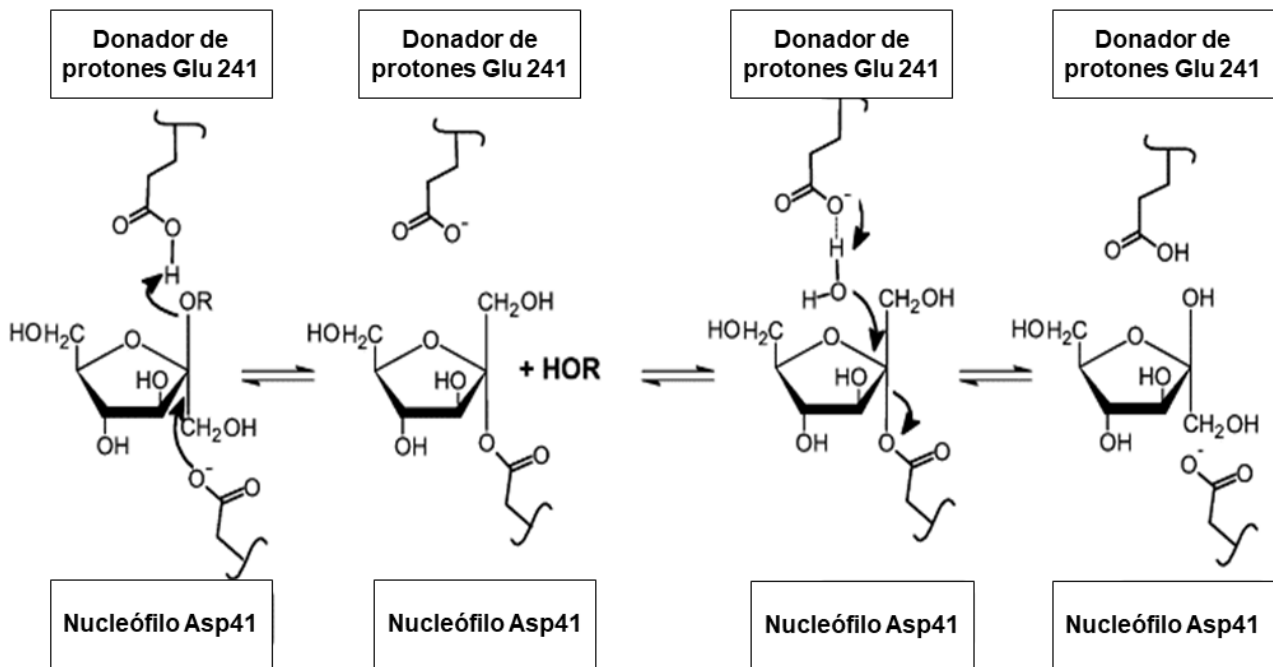


Figura 4. Mecanismo de reacción propuesto por Nagen para las exo-inulinasas. En la primera etapa hay un ataque nucleofílico del ácido aspártico 41 al carbono 2 mientras que el oxígeno del enlace glicosídico se protona con ayuda del ácido glutámico 241 rompiéndose este enlace. En una segunda etapa el ácido glutámico 241 se coordina con una molécula de agua para atacar al carbono 2 y liberar el aminoácido 41.

Se ha reportado que en algunas fructosilhidrolasas extraídas de plantas como en *Arabidopsis thaliana* hay cambios sutiles alrededor del sitio catalítico que aumenta o disminuye la afinidad del sustrato a hidrolizar. Verrhaest y colaboradores en 2007 usaron como modelo una invertasa y una fructanhidrolasa, ambas enzimas son capaces de llevar a cabo la hidrólisis de sacarosa, pero en particular la fructanhidrolasa tiene una baja actividad para hidrolizar este carbohidrato comparado con la invertasa (Verhaest, *et al.*, 2007). Los autores diferenciaron a estas dos enzimas mediante los alineamientos múltiples de distintas secuencias de invertasas y fructanhidrolasas. Encontraron que

existen cinco regiones conservadas, una de estas regiones se encuentra muy cercana al sitio de catálisis el cual difiere entre ambos tipos de enzimas. También observaron una delección de los últimos dos residuos en las fructosilhidrolasas, mientras que las invertasas se encuentra un residuo de Lys que es un fuerte formador de puentes de hidrógeno. Además de esto, demostraron que la presencia de un residuo de Ser o de Gly antes del primer motivo catalítico en las fructanhidrolasas aumenta el grado de inhibición a la sacarosa, mientras que las invertasas en esa misma posición se encuentra un residuo de Ile (Verhaest *et al.* 2007). Tomando en cuenta la información anterior cambios sutiles alrededor del sitio catalítico aumentan o disminuyen la afinidad del sustrato a hidrolizar.

Por otro lado, el análisis de una exoinulinasa de *Penicillium* sp. TN88(BAC16208) por medio de simulaciones de acoplamiento molecular a la 1-kestosa, mostró que los residuos Asp22, Asp128, Asp179 y Ser84 forman puentes de hidrógeno con el sustrato (Singh y Shukla, 2012). En otro reporte, se encontró que la mutación His192 Ala, cerca del sitio catalítico en una exoinulinasa de *A. niger* afectaba la estabilidad y la actividad de la enzima (Arjomand , *et al.*, 2017).

Una zona muy importante que se ha identificado en varias enzimas de la familia 32 son el parche hidrofóbico presente en la cavidad catalítica compuesto normalmente por 3 Trp y 1 Phe como se muestra en la β -fructofuranosidasa de *S. occidentalis* (Figura 5). Se sabe que esta región esta conservada en este grupo de proteínas y algunos autores mencionan que cambios en esta zona podrían afectar la actividad catalítica (Álvaro-Benito, *et al.*, 2012).

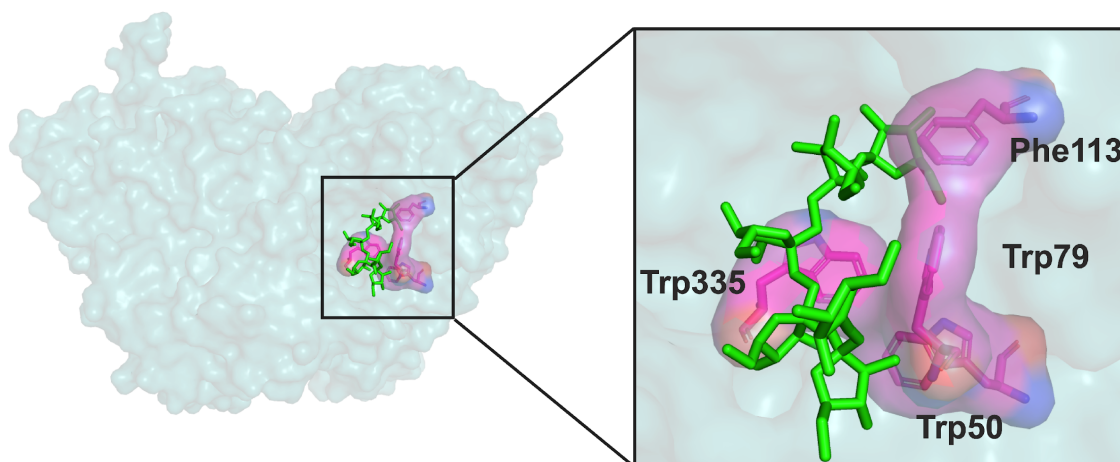


Figura 5. Representación en superficie de la β -fructofuranosidasa de *S. occidentalis* (3U14) con inulina. En el acercamiento se observa el parche hidrofóbico compuesto por los Trp50, 79, 335 y la Phe113 que se observa en color rosa en el complejo con inulina (verde).

Por otro lado, el dominio β sandwich es un arreglo que se encuentra ampliamente distribuido en muchas proteínas. Gracias al estudio estructural se ha podido entender la función que tiene esta región en las distintas proteínas en las que se encuentra. Los primeros casos en los que se estudió esta región fue en amilasas, celulasas, xilanasas, en donde se observó que el carbohidrato se

asocia a esta región que es independiente al sitio catalítico. Debido a esto, a esa región se le denominó módulo de reconocimiento a carbohidratos (MRC) (Lehtio, *et al.*, 2003).

Posteriormente se siguió estudiando este módulo y se ha clasificado en tres grandes grupos debido al arreglo espacial que comparten y al tipo de catálisis que realiza el dominio propela (endo o exo) (Figura 6).

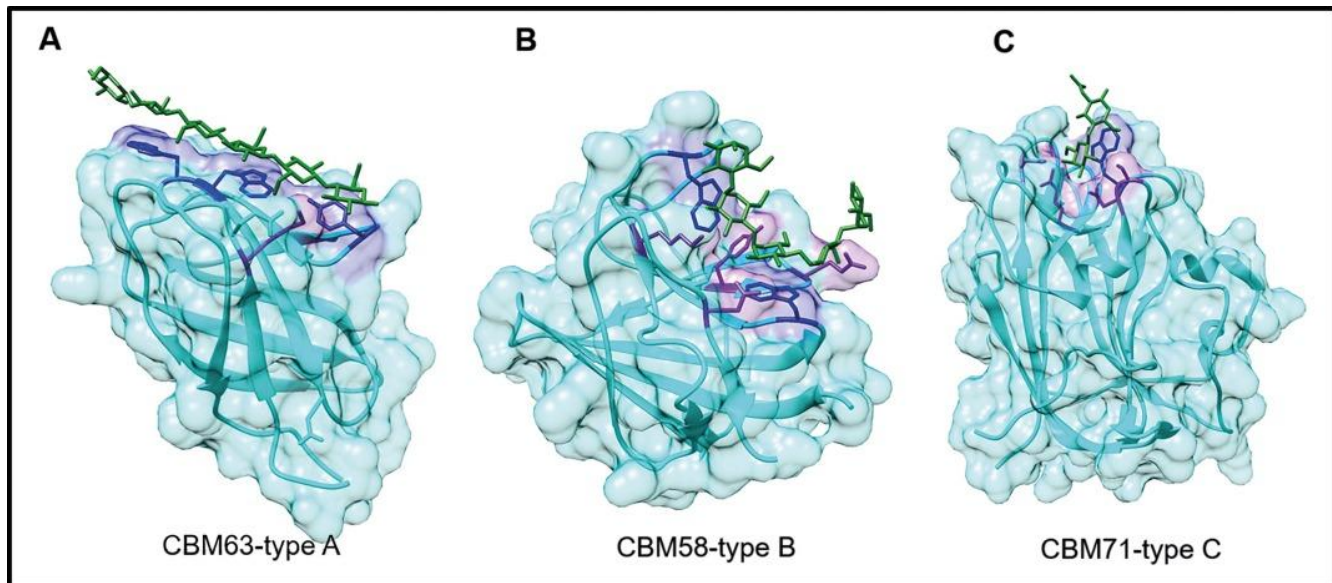


Figura 6. Representación en superficie de las tres clasificaciones que puede adoptar el dominio beta sándwich en el reconocimiento a carbohidratos. En A se muestra el complejo celohexosa (color verde) con la celulasa de *Bacillus subtilis* (4FER) en B se observa el complejo de la alfa amilasa de *Bacteroides thetaiotaomicron* (3K8L) con la maltopentosa (color verde) C complejo de β -galactosidasa de *Streptococcus pneumoniae* (4CUB) con N-acetilglucosamina (color verde). Tomada de (Armenta, *et al.*, 2017)

El primer grupo es denominado como grupo A, en este se encuentran enzimas que logran asociar polisacáridos que tienden a formar cristales como la celulosa o quitina. Estas proteínas muestran una topología planar en el β sandwich con una superficie hidrofóbica que capta a estos carbohidratos. Este tipo de enzimas tienen pequeña o nula actividad con oligosacáridos (Boraston, 2005).

El segundo grupo, es el B, en él se pueden encontrar enzimas tipo endo, en estas proteínas se observan dos regiones que componen el módulo de unión. La primera es un sitio de asas variables y la segunda es una región cóncava. En esta cavidad generada por ambas regiones se asocia el azúcar dejando un extremo con varias unidades del carbohidrato expuesto para ser catalizado (Abbott y Van Bueren, 2014).

Por último, el tercer grupo es el C, estas enzimas tienen una topología de bolsillo que es capaz de reconocer carbohidratos de cadena corta o regiones expuestas, a este grupo de enzimas generalmente presentan actividad exo (Gilbert , Knox y Boraston, 2013).

En todos estos casos la interacción enzima-sustrato es estabilizado mediante aminoácidos aromáticos particularmente triptófano y tirosina por medio de interacciones hidrofóbicas e interacciones tipo π . Sumado a esto también existen interacciones con aminoácidos polares como Glu o Asp así como residuos de serina que forman puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo del carbohidrato (Bolam , *et al.*, 2001).

Debido a la importancia que tienen estos aminoácidos en la estabilización del sustrato en el módulo de reconocimiento se han desarrollado diferentes investigaciones que han estudiado el efecto que tienen estos residuos en el reconocimiento y las consecuencias que generan si son mutados. Un ejemplo muy claro fue el estudiado en la β -1-4, galactosidasa de *Thermotoga maritima* en la cual se observó que al modificar el Trp508 o el Trp563 por Ala la enzima reduce diez veces su afinidad a un poligalactósido respecto a la enzima silvestre. Estos aminoácidos se ubican en el módulo a reconocimiento a carbohidratos y se cree que juegan un rol muy importante ya que generan una curvatura que es crítica en el reconocimiento con su sustrato (Cid, *et al.*, 2010).

Por otro lado, los trabajos que existen sobre inulinasas han sido de enzimas provenientes de hongos filamentosos y plantas, en ellos se ha tratado de entender cuál es el papel que juegan algunos aminoácidos cercanos a la triada catalítica y si existe algún cambio al ser modificados sin observar otras regiones más alejadas como las asas externas del dominio amino o el dominio carboxilo. En la bibliografía existen pocos estudios usando como modelo inulinasas provenientes de levaduras y nunca se ha analizado la interacción de la inulina de agave con el sitio catalítico.

En nuestro grupo, hemos aislado microorganismos a partir de residuos de la industria tequilera, capaces de utilizar inulina de agave como única fuente de carbono, y por tanto capaces de producir inulinasas distintas a las ya reportadas. Actualmente, en el laboratorio 314 del conjunto de la facultad de química, contamos con varias cepas del género *Kluyveromyces*. Entre ellas destaca *K. marxianus* ISO3, cuya inulinasa es un dímero de aproximadamente 256 kDa, con actividad de exoinulinasa sobre agavina y que presenta glicosilaciones (Trapala, *et al.*, 2020). Existe un reporte de una inulinasa de *K. marxianus* capaz de hidrolizar a la agavina (Arrizon, Morel, *et al.*, 2011). Sin embargo, la enzima obtenida de la cepa ISO3 es al menos 100 veces más activa frente a agavina y 1000 veces más activa frente a inulina de achicoria, que la enzima reportada.

En el año 2020 se reportó la estructura cristalográfica de la inulinasa de *K. marxianus* DMKU3-1042 que comparte el 99.3 por ciento de identidad con la enzima Inu-ISO3 (Li L & Su X., 2020). Esta estructura mostró que la enzima es un homo dímero que presenta glicosilaciones, con un arreglo espacial de mariposa similar al de la β -furanosidasa de *S. occidentalis* (Álvaro-Benito, *et al.*, 2012) (Figura 7).

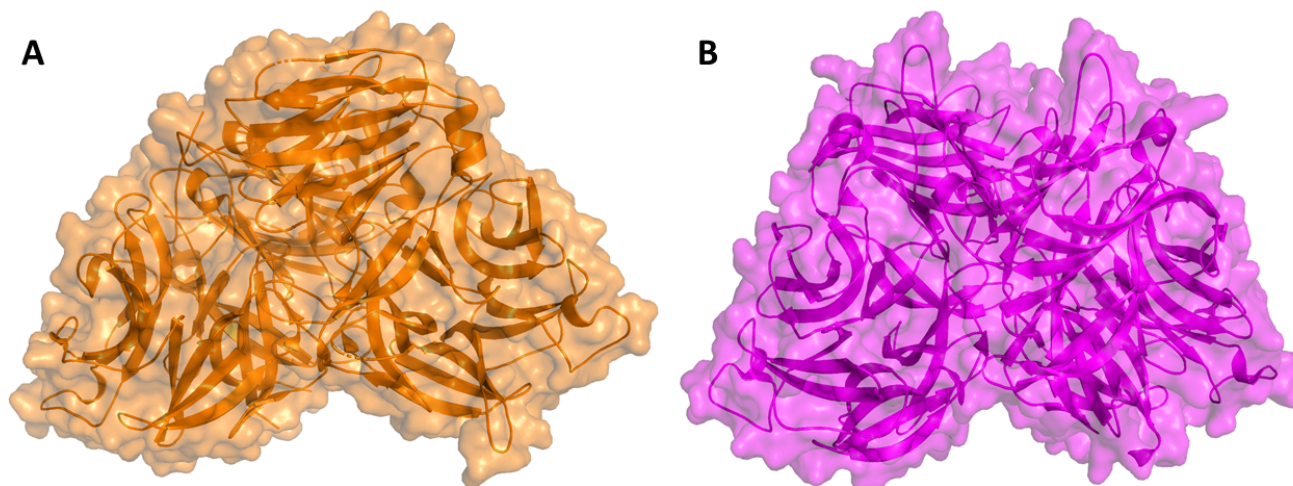


Figura 7. Representación en superficie de la estructura cristalográfica de A) exo-inulinasa de *K. marxianus* DMKU3-1042 (6J0T), B) β -fructofuranosidasa de *S. occidentalis* (3U14), hecha en el programa PyMOL.

La estructura cristalográfica de la inulinasa de *K. marxianus* DMKU3-1042 se puede emplear como punto de partida para modelar la interacción de la enzima con los diversos sustratos que puede hidrolizar utilizando técnicas computacionales, como la dinámica molecular (Figura 8).

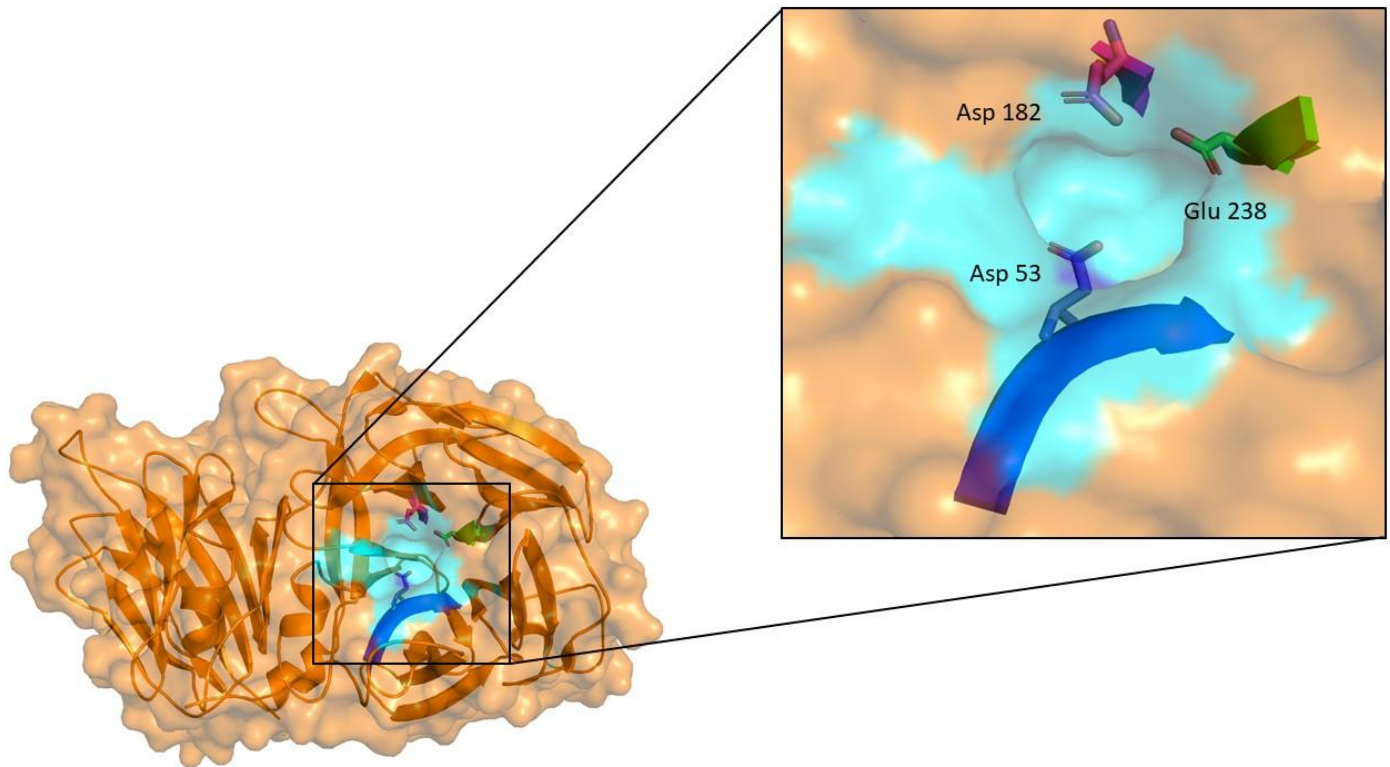


Figura 8. Representación en superficie de la exo inulinasa de *K. marxianus* (6J0T). En el acercamiento se muestra en color azul claro la cavidad catalítica, en azul marino se muestra el primer motivo, en color rosa el segundo y en verde el tercero. En *sticks* se muestra la tríada catalítica.

Actualmente, se han usado distintas técnicas computacionales con la intención de buscar nuevas respuestas y generar hipótesis que respalden la información experimental obtenida. Estas herramientas nos permiten obtener datos confiables que ayudan a eficientar el estudio de sistemas complejos reduciendo el tiempo y los costos. Existen diversos estudios que han permitido dilucidar desde la estructura de una proteína hasta el estudio de las interacciones enzima-sustrato en un complejo enzimático (Roda, Santiago, & Guallar, 2020).

Algunos grupos de trabajo han reportado diversos estudios computacionales usando inulinasas. Por ejemplo, usando modelado y acoplamiento molecular se encontraron algunos aminoácidos que podrían ser relevantes en la unión de la 1-kestosa con la exo inulinasa de *Penicillium* sp TN-88 (Singh & Shukla, 2012). En 2017 el grupo de Arjomand analizó el efecto de la mutación de la His192Ala usando ensayos experimentales y de dinámica molecular. Ellos observaron una disminución significativa en la actividad hidrolítica de la enzima hacia la inulina a nivel experimental. Además, los experimentos *in silico* revelaron que esta posición juega un papel crucial en la estabilidad de la proteína. (Arjomand , *et al.*, 2017).

En tiempos más recientes se encontró mediante análisis de restricciones y dinámica molecular que la mutación G338A promueve una mayor termoestabilidad en la exo inulinasa de *A. awamori* cuando fue probada experimentalmente (Dotsenko, *et al.*, 2023).

Estos estudios demuestran que las herramientas computacionales pueden ayudar a generar nuevo conocimiento que puede ser corroborado experimentalmente.

En este trabajo se usó un enfoque computacional usando dinámica molecular para encontrar aquellos aminoácidos que son relevantes en la unión del sustrato y la catálisis. Una vez obtenida una lista de posiciones a mutar se analizaron y compararon con la literatura reportada para elegir las mutantes a probar. Se obtuvieron las constantes cinéticas de cada mutante y se comparó su efecto con los resultados obtenidos de los ensayos *in silico*.

Esta investigación es fundamental para, en un futuro, entender la relevancia de algunos aminoácidos en la cavidad catalítica que son fundamentales en el reconocimiento y catálisis de los sustratos que usa la inulinasa de *K. marxianus* ISO3.

Hipótesis

Si se modifican los residuos polares y aromáticos cercanos a los motivos catalíticos entonces se modificará el reconocimiento y/o la catálisis de inulinas ramificadas (agavina).

Objetivos

Objetivo general

Entender el papel de los aminoácidos polares y aromáticos cercanos a los motivos catalíticos en la inulinasa de *K. marxianus* ISO3 que intervienen en el reconocimiento del sustrato.

Objetivos particulares

- Estudiar a la enzima recombinante para compararla cinéticamente con la enzima silvestre.
- Analizar los resultados obtenidos de las dinámicas moleculares de los distintos sustratos para proponer posibles aminoácidos que son importantes en el reconocimiento.
- Analizar las mutantes generadas por medio de los parámetros cinéticos para definir que aminoácidos son relevantes en el reconocimiento molecular del sustrato.

Materiales y métodos

Materiales

Material celular

- *Kluyveromyces marxianus* ISO3
- *Escherichia coli* DH5 α
- *Pichia pastoris* X33

Reactivos y kits

Reactivos y kits	
Agavina (Nekutli S.A.)	Fructooligosacáridos (Nekutli S.A.)
Acido 3,5-dinitrosalicílico (Sigma Aldrich)	Glucosa (Sigma Aldrich)
Fructosa (Sigma Aldrich)	Extracto de levadura (Sigma Aldrich)
Butanol (Sigma Aldrich)	Metanol (Sigma Aldrich)
Isopropanol (Sigma Aldrich)	Hidroxido de sodio (Merck)
Sulfato de magnesio (Merck)	Sacarosa (Merck)
Sulfato de amonio (Droguería cosmopolita)	Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific)
DNAzol (Invitrogen)	Agarosa (Invitrogen)
Fosfato monobásico (Merck)	Fosfato di básico (Merck)
Cloruro de sodio (Droguería cosmopolita)	Ácido clorhídrico (Sigma Aldrich)
Inulina de chicoria (Sigma Aldrich)	Ácido sulfúrico (Sigma Aldrich)
Persulfato de amonio (Sigma Aldrich)	Orcinol (Sigma Aldrich)
Acrilamida (JT Baker)	Bis acrilamida (JT Baker)
Azul de bromofenol (Sigma Aldrich)	EDTA (Sigma Aldrich)
SDS (Sigma Aldrich)	Ácido acético (Merck)
Marcador de masa molecular de proteínas precision plus protein dual color standarts (Biorad)	Marcador de masa molecular de DNA 1 Kb plus (Invitrogen)
Acetato de sodio (Sigma Aldrich)	Cloruro de potasio (JT Baker)
Cromatoplacas de capa fina de silica gel (Merck)	Kit de purificación de DNA QIAquick (Invitrogen)
Metabisulfito (Sigma Aldrich)	Reactivo de Schiff (Sigma Aldrich)
	Kit de calibración para exclusión molecular (Biorad)
Azul de dextrano (Biorad)	

Equipos

Equipos	
Centrífuga PrO-Research (Centurion Scientific Lid)	Centrífuga 5415c (Eppendorf)
Cromatógrafo de proteínas AKTA purifier (General Electric)	Fuente de poder (Major Science)
Cámara de electroforesis para DNA (Select Bioproducts)	Cámara de Electroforesis para proteínas (Biorad)
Espectro de luz UV Genesys 10S (Thermo Scientific)	Potenciómetro (Beckman)
Agitador orbital Aros 160 (Thermolyne)	Balanza analítica (Ohaus)
Termociclador (Applied Biosystems)	Nanodrop (Thermo Scientific)
Purificador de agua MilliQ (Millipore)	Incubadora innova 4330 (New Brunswick Scientific)
Termomixer (Eppendorf)	Baño de agua (IKA)
Ultra congelador ULT390 (Gs Laboratory)	Columna HisTrap Fast Flow de 5 mL (Sigma Aldrich)
Columna Superdex 200 de 24 mL (Sigma Aldrich)	Unidad de ultrafiltración (Millipore)
zetasizer μ V (Malvert)	
Liofolizadora FD1.0 (Heto)	

Purificación de DNA genómico de *K. marxianus*

Para extraer el DNA genómico de *K. marxianus*, se usó un cultivo saturado que se dejó crecer toda la noche en medio YPD, se centrifugó 5 min a 12000 rpm y se desechó el sobrenadante. El paquete celular se resuspendió en 200 μ L de buffer Harju que contiene 2% de triton 100, 100 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl pH 8 y 1 mM de EDTA, después se congeló con nitrógeno líquido y posteriormente se pasó a un baño a 95°C por 1 min para romper las células. Este paso se repitió dos veces. Se agitó vigorosamente por 30 s en vortex a máxima velocidad. A continuación, se adicionaron 200 μ L de cloroformo, se agitó por 2 min y se centrifugó 8 min a 12000 rpm. La parte superior que es la fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y se colocaron 400 μ L de etanol absoluto frío para precipitar el material genético. Se dejó en el congelador por 30 min, después se centrifugó 15 min a 14000 rpm, se removió el sobrenadante y se agregaron 500 μ L de etanol al

70%, se centrifugó y se removió el sobrenadante. Se dejó secar para remover el disolvente presente y se resuspendió en 50 μ L de agua estéril y se adicionó 1 μ L de RNAasa.

Obtención de la proteína recombinante

Usando el DNA genómico se amplificó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) el gen de la inulinasa usando los siguientes cebadores:

Cebador F = GCCGCGGCAAAGGAGTCAGTGCT. Cebador con el sitio *SacII*

Cebador R = GCTCTAGACAAACGTAAATTGGGTAACG. Cebador con el sitio *XbaI*

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes para una reacción de 50 μ L:

5 μ L de buffer 10X de la polimerasa Pfu de la marca Promega, 5 μ L de dNTPs, 2.5 μ L de cebador F, 2.5 μ L de cebador R, 2 μ L de DNA plasmídico, 2 μ L de polimerasa pfu, 5 μ L de DMSO y 26 μ L de agua estéril.

Las condiciones que se usaron en el termociclador fueron 30 ciclos que se desarrollaron de la siguiente forma: 30 s a 94°C, 30 s a 52°C, 90 s a 72°C.

Una vez amplificado se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio para observar el producto de PCR.

Verificado el producto de PCR se purificó el DNA usando el kit QIAquick de la marca Invitrogen y se cuantificó por medio de un nanodrop. Posteriormente se realizó una doble digestión tanto del producto de PCR, que sirvió como inserto, como del plásmido pPICZ α B empleando las enzimas *SacII* y *XbaI* de la marca NEB. La digestión se realizó siguiendo las indicaciones del proveedor las cuales fueron 2.8 μ g de inserto y 1.53 μ g de plásmido en reacciones por separado. Se les adicionó 5 μ L de buffer CuSmart, 1 μ L de la enzima *XbaI* y 1 μ L de *SacII* y se llevó a un volumen de 50 μ L empleando agua destilada estéril. La reacción se dejó a 37°C durante 3 h.

Transcurrido el tiempo de reacción se colocó el producto de digestión en una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, se verificó la linealización del plásmido, se cortó la banda para purificarse con el kit QIAquick y se cuantificó el producto purificado usando el nanodrop. Se montó la reacción de ligado entre el vector pPICZ α B y el inserto amplificado inmediatamente y se dejó reaccionar toda la noche a 4°C usando los productos de digestión purificados a una proporción 5:1 de inserto: vector, la DNA ligasa T4 de la marca NEB y el buffer de la ligasa incluido por el proveedor.

El producto de la reacción de ligación se transformó usando células quimio competentes de *E. coli* DH5 α usando el siguiente protocolo: se colocó una alícuota de células de *E. coli* en un baño de hielo por 5 min para descongelarse. Se mezcló el producto de la ligación con 100 μ L de buffer que contenía 100 mM de KCl, 30 mM de CaCl₂ y 50 mM de MgCl₂. La mezcla se agregó a las células

competentes y se dejó incubar por 30 min en hielo. Se les dio un choque térmico a las células a 42°C durante 90 s, después se pasó a un baño con hielos por 2 min, posteriormente se agregó 500 µL de medio LB y se incubó 1 h a 37°C. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 12000 rpm por 5 min, se retiró el sobrenadante y el paquete celular se sembró en placas de LB con zeocina a una concentración de 25 µg/mL durante toda la noche a 37°C.

Las colonias que crecieron se resembraron en medio LB líquido con zeocina a la misma concentración que las placas (25 µg/mL) para realizar la extracción de DNA plasmídico. Este material genético fue mandado a secuenciar a la compañía Laragen para verificar que el gen de interés no contenía mutaciones o secuencias de paro que provocaran defectos o errores al realizar los ensayos de expresión.

Una vez obtenido el plásmido y verificada la secuencia se digirió con la enzima *Pme1* para linealizar el vector para ser incorporado a células electro competentes de *P. pastoris* X33 por medio de electroporación siguiendo las especificaciones del fabricante.

La levadura se creció en placas de YPDS (10 g/L extracto de levadura, 20 g/L de peptona, 20 g/L de glucosa, 25 g/L de agar y 182 g/L de sorbitol) con zeocina a una concentración de 50 µg/mL como marcador de selección a 30°C durante 48 a 72 h.

De las colonias que crecieron se tomó un poco para realizar PCR de colonia usando los cebadores que amplifican a la inulinasa y usando las mismas condiciones de amplificación que se emplearon para el gen de inulinasa. El resto de la colonia se resembró en placas de YPD (10 g/L extracto de levadura, 20 g/L de peptona, 20 g/L de glucosa, 25 g/L de agar) con zeocina a una concentración de 100 µg/mL para confirmar la resistencia de la bacteria al antibiótico.

Ya confirmado el crecimiento en la placa y amplificando el gen de la inulinasa por medio de la PCR de colonia se colocó un poco de la colonia en medio YPD con zeocina para realizar glicerolos que fueron guardados a -70°C para posteriormente ser usados para expresar la proteína recombinante.

Mutagénesis sito dirigida de la inulinasa

Para todas las mutantes generadas en este trabajo se usó como molde el plásmido con el gen (pPICzαB-INU-ISO3) que se amplificó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa y se incorporó cada mutación a través de los cebadores siguiendo el protocolo modificado de QuickChange (Xia, *et al.*, 2015). Los cebadores empleados se muestran en la Tabla 2.

Una vez amplificado el material genético, se usó para transformar células quimio competentes de *E. coli* DH5α como anteriormente se describió y se hicieron crecer en medio LB con zeocina como marcador de selección a 37°C durante 16 h.

Las colonias que crecieron se resembraron en medio LB líquido con zeocina para realizar la extracción de DNA plasmídico. Cada plásmido purificado fue mandado a secuenciar del promotor aox 1 al terminador aox1 a la compañía Laragen para verificar que solo contenía la mutación de interés y no contenía secuencias de paro.

Una vez verificada la mutación, se usó el mismo protocolo antes descrito para transformar las células de *P. pastoris* X33 con el plásmido que contenía la mutante.

Tabla 2. Secuencia de los cebadores para cada mutante.

Mutante	Cebadores
Trp79:Ala	Forward: 5` cc acg atc gct ggt act cca ttg tac tgg ggt 3`
	Reverse: 5`gg agt acc agc gat cgt ggc tgc tgg gtt 3`
Phe113:Ala	Forward: 5` ggt gcg gct agt ggt agt atg gtt atc ga 3`
	Reverse: 5` t acc act agc cgc acc agc gtc g 3`
Thr225:Ala	Forward: 5`g act ggt gct caa tac gaa tgc cca ggt ct 3`
	Reverse: 5` ttc gta ttg agc acc agt cca gcc gtg g 3`
Gln236:Ala	Forward: 5`act ggt acc gct tac gaa tgc cca ggt cta 3`
	Reverse: 5`gca ttc gta agc ggt acc agt cca gcc gtg 3`
Gln339:Ala	Forward: 5`aa tac gcc gct caa gcc cca act gac 3`
	Reverse: 5` ggc ttg agc ggc gta ttg cca gt tag 3`

Purificación de la inulinasa recombinante

Con la finalidad de purificar a la proteína extracelular y las mutantes generadas, se creció la levadura *P. pastoris* x33 con la incorporación del material genético a las mejores condiciones previamente determinadas (94 h de incubación, 30 °C, 230 rpm y adicción cada 24 h de 1% de metanol como inductor), posteriormente el medio de cultivo se centrifugó a 10000 rpm a 4°C por 15 min para separar las células del sobrenadante. El sobrenadante recuperado se liofilizó y se resuspendió en buffer de fosfatos 50 mM pH 7.2 más 100 mM de NaCl y 25 mM de imidazol.

El sobrenadante resuspendido se hizo pasar por una columna de afinidad His trap HP de 5 mL usando como fase móvil el mismo buffer en el que se preparó la muestra liofilizada y un segundo buffer (fosfatos 50 mM pH 7.2 más 100 mM de NaCl más 1 M de imidazol) que sirvió para eluir la proteína.

Se colectaron las distintas fracciones obtenidas y se realizó la determinación de la actividad enzimática y la cuantificación de la proteína. Una vez identificada la fracción con la proteína de

interés se realizó una electroforesis en gel SDS-PAGE seguida de una tinción con azul de coomassie para verificar la pureza de la muestra.

Masa molecular de la enzima

Para determinar la masa molecular de la enzima se emplearon dos técnicas, por un lado, cromatografía de exclusión molecular y por otro, dispersión dinámica de luz. Para la técnica de cromatografía por exclusión molecular se empleó una columna Superdex 200 10/300, se usó como fase móvil buffer de fosfatos 50 mM a un pH de 7.2 con 500 mM de cloruro de sodio. Esta columna se calibró usando el kit de la marca Biorad catálogo 1511901. Este kit contiene una mezcla de proteínas: vitamina B12, mioglobina de equino, ovoalbumina de gallina, gama globulina bovina y tiroglobulina bovina, con una masa molecular de 1.35, 17, 44, 158 y 670 kDa respectivamente. Para determinar el volumen muerto de la columna se ocupó azul de dextrano.

Se mezcló una alícuota de 0.1 g del kit de calibración en 500 microlitros de buffer de fosfatos y se inyectó a la columna a un flujo de 0.5 mL/min. De la misma forma se procedió con el azul de dextrano. Una vez obtenido los volúmenes de elución de cada patrón se calculó el factor Ka que es

$$Ka = \frac{(Vol.muestra - vol.muerto)}{(Vol.total - vol.muerto)}.$$

Esta fórmula relaciona el volumen de elución de la muestra, el volumen muerto y el volumen total de la columna. Una vez obtenidos estos valores se graficaron contra sus respectivos pesos moleculares en forma logarítmica. Se obtuvo la ecuación de la recta y a partir de ella se calculó la masa molecular de la muestra.

Para la determinación de la masa molecular mediante la dispersión dinámica de luz se empleó el equipo zetasizer μV con celdas de vidrio. Esta técnica tiene como fundamento hacer pasar un láser que difracte con las partículas presentes en la solución, de esta forma al colisionar el haz de luz se difracta. Este fenómeno se puede usar para determinar la masa molecular partiendo de la suposición de que la partícula es una esfera que generara ángulos de difracción según su tamaño. Para usar esta técnica primero se colocaron 500 μL de la proteína a una concentración de 100 $\mu g/mL$ en la celda y se equilibró 25°C por 10 min, posteriormente se realizaron 10 mediciones de 30 s cada una. Una vez obtenido el diámetro de la proteína se estimó la masa molecular tomando en cuenta este dato.

Determinación de la glicosilación por tinción de Schiff

Para determinar el grado de glicosilación de la proteína, se llevó a cabo una electroforesis SDS-PAGE de 25 μL de la muestra a una concentración de 1.85 $\mu g/mL$. Durante 2 h se corrió el gel a un

voltaje de 100 V, posteriormente se lavó el gel de policarilamida al 10 % con agua Milli Q para retirar el SDS. Se fijó el gel con una solución de metanol al 50 % durante 60 min, terminado este paso se lavó dos veces durante 20 min cada una con agua Milli Q. Una vez lavado se agregó una solución oxidativa de ácido peryódico al 1 % (m/v) por 60 min para generar grupos aldehído en el carbohidrato, posteriormente se lavó dos veces con agua Milli Q por 20 min y se colocó en una solución de Schiff hasta ver bandas magentas, este color generado por la reacción entre el aldehído y el reactivo de Schiff. Se retiró la solución anterior y se dejó en una solución de metabisulfito al 0.5 % por 2 h. Por último, se dejó destiñendo con agua MilliQ. Para esta técnica se usó como control positivo a la proteína peroxidasa de rábano que presenta glicosilaciones y como control negativo albumina bovina.

Desglicosilación

Una vez identificada que la inulinasa de *K. marxianus* recombinante está glicosilada se usaron 3 enzimas PNGasa F, endoglicosilasa H y manosidasa. Para cada enzima se repitió el mismo procedimiento, se colocó 10 mg de inulinasa recombinante pura en un volumen total de 100 μ L, se adicionó 10 μ L de buffer de fosfatos pH 7.2 500 mM, 0.1 mg de la enzima desglicosilante y el resto del volumen de completo con agua milliQ. La reacción se dejó toda la noche y se verificó el proceso de desglicosilación por medio de electroforesis de gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de coomassie.

Ensayo enzimático

En un tubo eppendorf de 1.5 mL se colocaron 1000 μ L de buffer de acetatos 20 mM a un pH 5.5, 300 μ L una solución de agavina previamente esterilizada por ultrafiltración al 5 % m/v y 200 μ L de proteína. La reacción enzimática se colocó en un termomixer modelo AG 22331 de la marca Eppendorf a 50 °C por un tiempo de 15 min y posteriormente se inactivó la reacción colocándola a 100°C por 10 min. A la par de la reacción, se realizaron dos controles negativos a las mismas condiciones usando buffer e inulina y por otro lado solo buffer y enzima. La determinación de la actividad enzimática se realizó usando el ensayo de azúcares reductores con el reactivo de DNS. El resultado se expresó como actividad volumétrica U/mL donde la U es igual a un μ mol de equivalentes de fructosa por minuto de reacción.

Ensayo de azúcares reductores

El ensayo de azúcares reductores se realizó usando la metodología de Miller, (1959) con algunas modificaciones. Se colocó en un tubo de ensayo de 5 mL 0.2 mL de buffer de acetatos 50 mM a un pH de 5, 0.1 mL de muestra y 0.6 mL de reactivo de DNS. Los tubos se calentaron a 90°C por 5 min, terminado el tiempo se enfriaron en hielo por 20 min y se agregaron 4 mL de agua destilada a cada muestra.

Las muestras se midieron a una longitud de onda 540 nm y para determinar la concentración de cada una se realizó una curva patrón de fructosa como referencia con intervalos de concentración de 0 a 0.58 μ M. El resultado se reportó como μ mol equivalentes de fructosa.

Caracterización enzimática de la inulinasa recombinante

Se realizaron ensayos con la enzima pura en buffer de fosfatos 5.5 con 1 % (m/v) de agavina durante intervalos de tiempo que fueron de 0 hasta 18 min a una temperatura de 50 °C con una cantidad de enzima de 5.93 μ g con una actividad de 1720 U/mL. Este procedimiento se usó para verificar el tiempo en el cual se mantenía la reacción en velocidad inicial. La cantidad de fructosa producida por esta reacción se determinó por el método de azúcares reductores DNS.

Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad enzimática

Una vez purificada la enzima y verificada la velocidad inicial se llevó a cabo la reacción enzimática en buffer de fosfatos pH 5.5 con 1% de agavina, por 10 min a 150 rpm y se varió la temperatura (30, 40, 50, 55, 60 y 70 °C). La reacción se detuvo colocando las muestras a 95°C por 5 min. Se cuantificaron azúcares reductores por el método de DNS para determinar la actividad enzimática y se analizaron las muestras para determinar la mejor temperatura.

Ya determinada la mejor temperatura de reacción, se evaluó el efecto del pH en un intervalo de 3.5 a 7.5 usando buffer de fosfatos a 50 mM y la mejor temperatura obtenida (50 °C).

Ensayos cinéticos

Se determinaron las mejores condiciones de reacción para la enzima recombinante y sus mutantes para cada sustrato evaluando diferentes valores de temperatura (40°C, 50°C y 60°C) así como diferentes pH (4.5, 5.5 y 6.5). El ensayo con levano no se llevó a cabo por la baja actividad presentada.

Una vez obtenidas las mejores condiciones de reacción para cada sustrato se llevaron a cabo los ensayos de cinética enzimática variando la concentración del sustrato que en caso de la agavina fueron de 0.93 mM a 5.58 mM. La masa molecular de la inulina de agave fue de 2700 Da determinado por exclusión molecular.

Para el caso de la inulina de chicoria se usaron concentraciones de sustratos que van de 0.25 mM a 2.5 mM. La masa molecular que se usó para llevar a cabo el cálculo de la concentración fue de 4753 Da determinado por exclusión molecular.

Las concentraciones de sacarosa para la determinación de los parámetros cinéticos fueron de 29.21 mM a 291.1 mM. Para todos los ensayos se adicionó una cantidad de 5.93 μ g de enzima pura a un volumen final de reacción de 0.5 mL, cada reacción se llevó a cabo por duplicado.

Dinámica molecular

Los experimentos de dinámica molecular se llevaron de la siguiente forma, se usó como punto de partida la estructura de la proteína cristalizada de la inulinasa de *K. marxianus* DMKU3-1042 (6J0T) depositada en el protein data bank (PDB). Para los ligandos se tomaron de complejos previamente obtenidos y depositados en bases de datos, por ejemplo, la inulina de chicoria se tomó de complejo de la β -fructofuranosidasa de *S. occidentalis* con este carbohidrato (3U14). Para la estructura de la sacarosa se tomó del complejo con 1-exohidrolasa de *Cichorium intybus*. En el caso de la agavina se usó como molde la estructura de la inulina de chicoria y se le adicionaron unidades de fructosa en posición β -2,6 usando el programa spartan.

Cada complejo se construyó superponiendo tanto la estructura de la inulinasa como la del carbohidrato en complejos experimentales como el de la β -fructofuranosidasa de *S. occidentalis* (Figura 9). Todos los complejos se construyeron de la misma forma que la antes descrita.

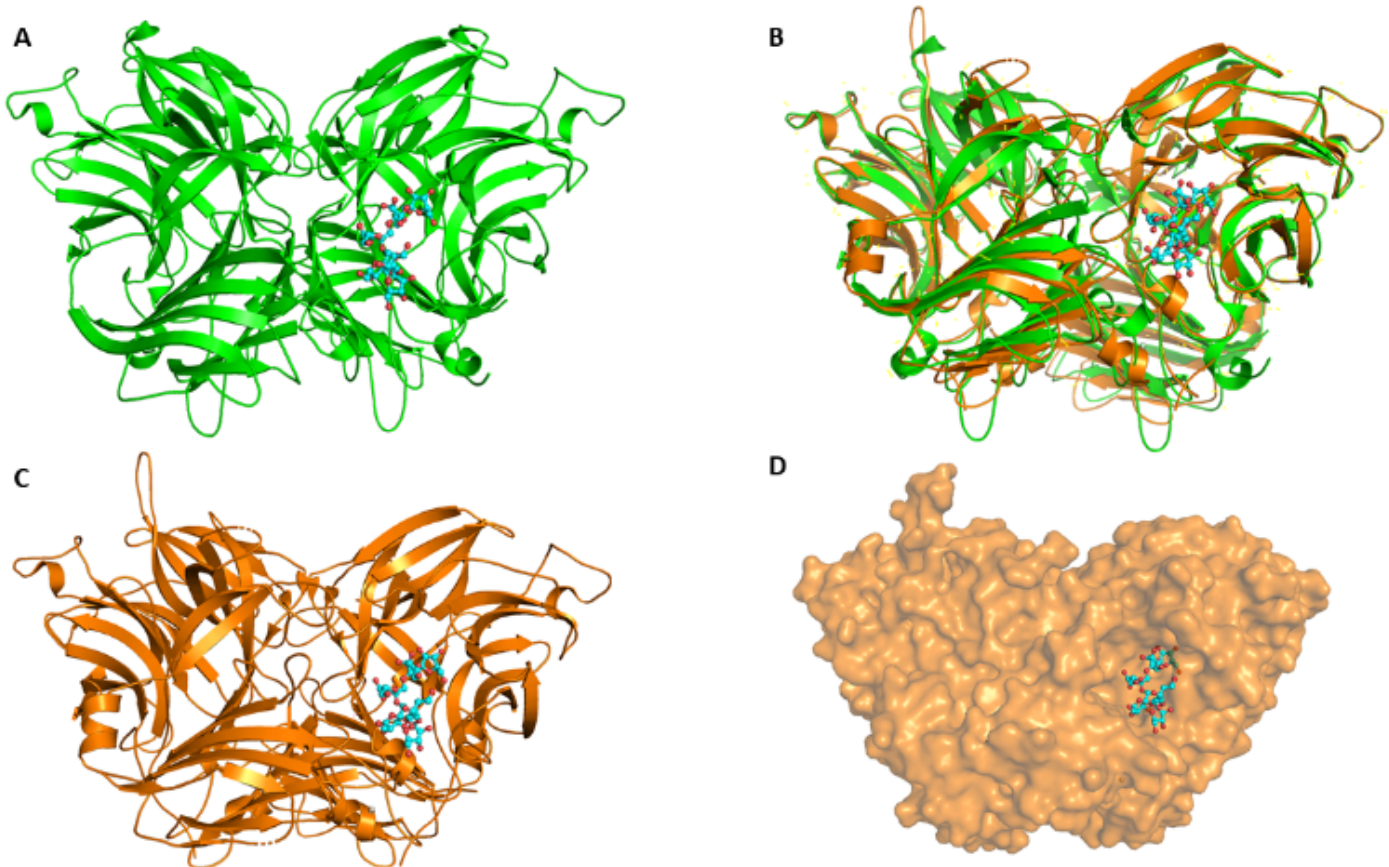


Figura 9. Construcción del complejo inulinasa de *K. marxianus* con inulina. A. Se descarga el complejo β -fructofuranosidasa (verde) de *S. occidentalis* con inulina (azul y rojo) (3U14), B posteriormente se descarga la estructura de la inulinasa de *K. marxianus* (naranja)(6J0T) y se alinea con el complejo β -fructofuranosidasa-inulina, C Se eliminan los átomos de la proteína de *S. occidentalis* dejando a la inulina y a la inulinasa. D. Se observa el nuevo complejo inulinasa de *K. marxianus* con inulina.

Una vez obtenido el complejo se llevó a cabo la dinámica molecular usando el programa gromacs 5.14, el campo de fuerza amber 99SB. El complejo se colocó en un cubo de aristas de 14 Å solvatado con un modelo de agua spce. Se balancearon las cargas del sistema usando Na^+ y Cl^- hasta llegar a la neutralidad. Se equilibró el sistema aplicando una minimización de energía usando 5000 pasos para ajustar la orientación del solvente y eliminar choques locales. Se usó una temperatura de 323 K a la cual se llegó usando un ensamble NVT de 200 ps y una presión de 1 bar usando un ensamble NPT de 140 ps. La temperatura y la presión se controlaron usando un termostato Berendsen y un baróstato de Parrinello-Rahman respectivamente. Las energías de repulsión y atracción entre pares se calcularon con el potencial de Lennard-Jones mientras que las interacciones electrostáticas de largo alcance se calcularon usando el método simplificado de partícula en la malla de Ewald (PME). Las dinámicas de la proteína sin mutar con los distintos ligandos se corrieron durante 100 ns y 10 ns para las mutantes propuestas. Una vez concluidas las

simulaciones se realizó el análisis de cada dinámica observando la estabilidad de la proteína midiendo el RMSD del esqueleto de la proteína. La estabilidad del complejo se midió determinando el RMSD entre la proteína y el carbohidrato. Por otro lado, en los intervalos de tiempo donde el complejo fue más estable se calculó la energía de unión de cada aminoácido al carbohidrato usando el análisis de mecánica molecular de área superficial de Poisson-Boltzmann (MMPBSA por sus siglas en inglés). Una vez identificado los aminoácidos con mayor energía de unión se calculó la distancia mínima entre el aminoácido y el ligando durante el intervalo de tiempo analizado. Cada simulación fue llevada a cabo por duplicado, así como su respectivo análisis.

Resultados

Obtención de la inulinasa recombinante de *K. marxianus* ISO3

Se comenzó el trabajo extrayendo el DNA genómico de la levadura *K. marxianus* ISO3 por medio del protocolo descrito por Harju y colaboradores en 2004 (Harju *et al.*, 2004), este material genético se usó como molde para amplificar el gen de interés usando los cebadores con los sitios *SacII* y *XbaI*. Se llevaron a cabo distintas reacciones de PCR usando varias polimerasas de alta fidelidad (Kod,PFU, Phusion, HFP taq) para que el amplicón obtenido no presentara mutaciones. En la Figura 10 se muestra la electroforesis en gel de agarosa de los productos de reacción de PCR de las distintas polimerasas. Se observa que las reacciones que se efectuaron con las polimerasas Kod y Phusion (carril C y D) no lograron amplificar el gen de la inulinasa. Por otro lado, las enzimas HFP taq y PFU (carril E y F) lograron amplificar el gen de interés que tiene un peso alrededor de las 1500 pb.

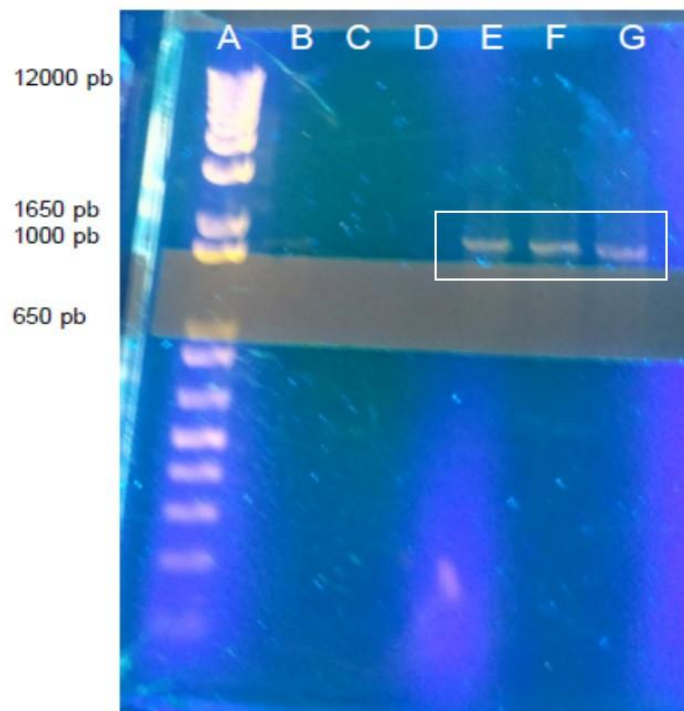


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio de las distintas reacciones de PCR. Carril A: marcador de masa molecular, B: carril vacío, C: Kod, D: Phusion, E: HFP taq. F: PFU, G: control positivo (taq polimerasa). Cada carril contenía 5 μ L de muestra

Ligado y transformación del inserto

Una vez obtenido estos resultados se purificaron las bandas de interés y se cuantificó para ser ligado al vector pGEM T-Easy. Para realizar la reacción de ligado se usó una relación 3:1 inserto:vector (80 ng/ μ L:27 ng/ μ L). Posteriormente se llevó a cabo la transformación de células competentes de *E. coli* DH5 α que se hicieron crecer en medio LB-ampicilina-Xgal-IPTG a 37°C.

Del ensayo realizado con el inserto obtenido de la polimerasa PFU se obtuvieron sólo colonias azules indicando que solo teníamos el vector vacío. Por otro lado, del inserto amplificado con la HFP taq se lograron obtener colonias azules y blancas. De la caja Petri se seleccionaron 6 colonias blancas que se crecieron en medio líquido LB-ampicilina para posteriormente realizar la extracción de DNA plasmídico.

En la Figura 11 se puede observar que todas las muestras contienen el plásmido con el inserto ya que se aprecia una banda entre 4 a 5 Kb que corresponde al peso esperado que es de 4500 pb. Una vez confirmada la presencia de plásmido con el inserto se llevó a cabo una digestión del material genético con la enzima *EcoRI* con la finalidad de corroborar que el inserto que contenía fuera el correcto. Se determinó teóricamente el patrón de restricción usando el programa Serial Cloner tomando en cuenta las secuencias del vector como la del inserto. Los resultados de la restricción teórica del vector con el inserto indicaban la presencia de tres bandas con los siguientes pesos moleculares 3058, 1223 y 439 pb respectivamente.

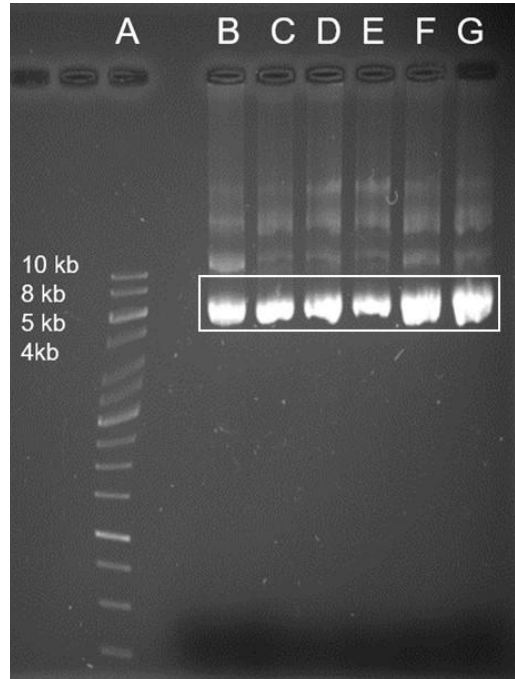


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñida con bromuro de etidio de los plásmidos extraídos de las colonias con transformación positiva. Carril A: marcador de masa molecular, del carril A al G las 6 colonias blancas.

Se llevó a cabo la restricción de los plásmidos con la enzima ya antes mencionada y se realizó una electroforesis en gel de agarosa que posteriormente fue teñido con bromuro de etidio con la finalidad de ver los productos de la reacción. En la Figura 12 se logra observar que las seis muestras que fueron colocadas en los carriles del B a la G respectivamente, presentan el patrón de restricción teórico esperado. Con estos resultados obtenidos se decidió mandar a secuenciar los seis plásmidos ya que, aunque presentaban el patrón teórico correcto para nuestro inserto se debía

tener certeza de que las secuencias presentes en ellos no contenían mutaciones que truncaran el producto o modificaran a nuestra proteína de interés.

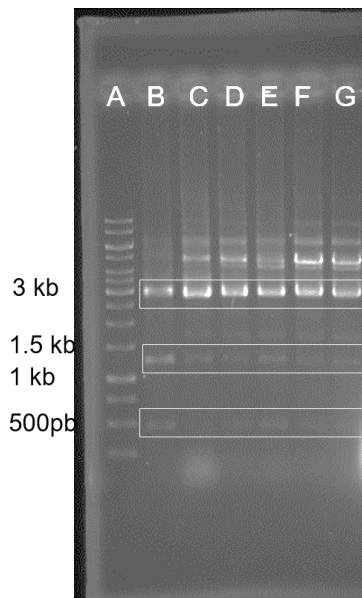


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosaal 1% teñido con bromuro de etidio de las reacciones de restricción usando la enzima *EcoRI*. Carril A: marcador de masa molecular, del carril B al G las 6 colonias blancas.

Los plásmidos se enviaron a la empresa Laragen para ser secuenciados desde la región T7 que se encuentra rio arriba del sitio de clonación múltiple hasta la región SP6 que se encuentra rio abajo del sitio múltiple de clonación con la finalidad de tener una buena cobertura al momento de secuenciar el inserto.

Los resultados fueron analizados por medio del programa Serial Cloner en los cuales se observó que tres de las colonias positivas contenía codones de paro que truncaban el producto, otras dos colonias contenían mutaciones que modificaban el producto y una no presentaba mutaciones que afectaran el producto.

Se realizó un blast con la secuencia que no presentó mutaciones y se encontró que el inserto codifica a la proteína inulinasa con un 100% de identidad y 98% de cobertura con la secuencia ya reportada de *K. marxianus* DMKU3.

Una vez confirmada la secuencia del gen la inulinasa se realizó una subclonación haciendo una doble digestión con las enzimas de restricción *SacII* y *XbaI* tanto del plásmido pGEM-INU y el pPIC α B como se muestra en el mapa de la construcción (Figura 13A). Una vez concluidas ambas restricciones se realizó una electroforesis para corroborar la digestión del vector, como se muestra en la Figura 13B, se observa en el carril B la digestión del vector pPIC α B con un peso superior a

las 3000 pares de bases, mientras que en el carril C se observa la digestión del inserto con un peso cercano a los 1650 pares de bases.

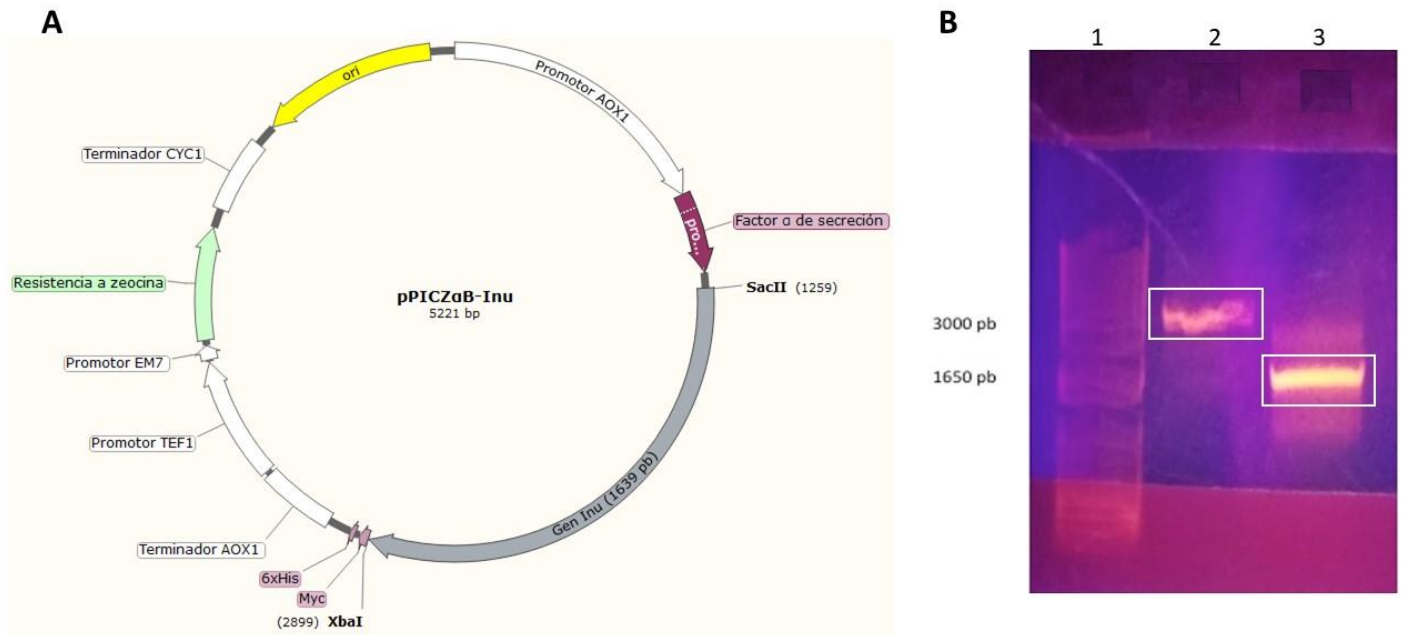


Figura 13. (A) Mapa de la construcción pPICZ α B-Inu y (B) la electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio de la doble restricción usando las enzimas SacII y XbaI. Carril 1: marcador de masa molecular, 2: vector pPICZ α B linealizado, 3: inserto.

A partir del gel se purificaron ambas bandas usando el kit de purificación de DNA QIAquick y se cuantificó el DNA usando el espectrofotómetro modelo NanoDrop 2000 de la marca Thermo Scientific. Se obtuvieron las siguientes concentraciones: para el inserto se tuvo una concentración de 156 ng/ μ L y del vector se obtuvo una concentración de 62.7 ng/ μ L.

Tomando en cuenta estas concentraciones se decidió usar 1 μ L de vector y 2 μ L de inserto para tener una concentración 5 veces mayor de inserto que de vector para realizar la ligación. Para llevar a cabo el proceso de ligado se empleó 1 μ L de enzima T4 DNA ligasa, 1 μ L del buffer de ligación y 5 μ L de agua estéril para tener un volumen de 10 μ L de reacción que se dejó durante toda la noche a 4°C.

Ya que se concluyó la ligación entre el plásmido y el inserto, se realizó la transformación de células de *E. coli* DH5 α con 5 μ L de la reacción de ligado usando choque térmico. Una vez realizado este proceso se hicieron crecer las células a 37°C por 18 h en medio sólido LB bajo en sales con 25 μ g de zeocina por mL de medio como marcador de selección. De las colonias que crecieron se

colocaron en medio líquido LB con zeocina durante 18 h a 37°C para realizar la extracción de plásmido.

Una vez obtenido el plásmido de cada colonia se realizó una electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Se muestra en la Figura 14 que del carril B al H se encuentran los plásmidos extraídos de 7 colonias. Se observa que únicamente el carril E tiene un plásmido con un peso menor a los demás.

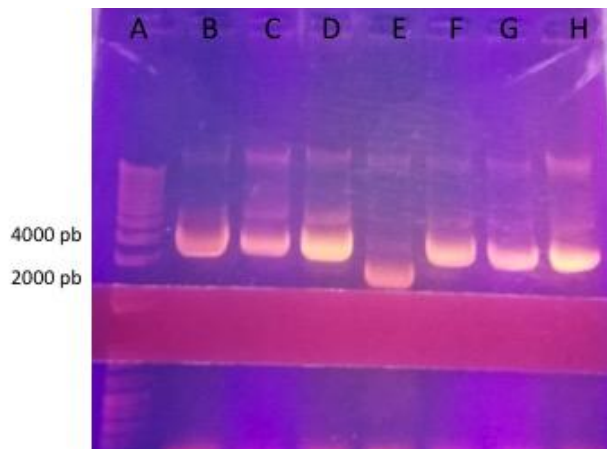


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio de los plásmidos obtenidos de la extracción alcalina de las clonas obtenidas. Carril A: marcador de masa molecular, del carril B al H plásmidos de las 7 colonias seleccionadas.

Una vez que se corroboró la presencia del plásmido se realizó la restricción usando la enzima *EcoRI* con la finalidad de corroborar la presencia del inserto. Se determinó teóricamente el patrón de restricción usando el programa Serial Cloner tomando en cuenta la secuencia del vector y del inserto cuyos pesos individualmente son 3957 pb y 1624 pb respectivamente. Los resultados de la restricción teórica del vector con el inserto indicaban la presencia de 2 bandas con los siguientes pesos 3962 y 1259 pares de bases. Por otro lado, el patrón del vector sin inserto fue de una sola banda de un peso de 3597 pares de bases.

En la Figura 15 se muestra la electroforesis en gel de agarosa de la digestión de los plásmidos del carril B al H. Se observó que en el carril E solo hay una banda que esta entre el 3000 y 4000 pares de bases por lo que el plásmido de la colonia E no contenía el inserto. El resto de los plásmidos presentaron un patrón de dos bandas una entre 3000 y 4000 pares de bases y la segunda entre 1000 y 1650 pares de bases que corresponderían al patrón teórico predicho anteriormente. Se seleccionó el plásmido B para continuar con el proceso de transformación en células de *P. pastoris* X33 usando el método de electroporación.

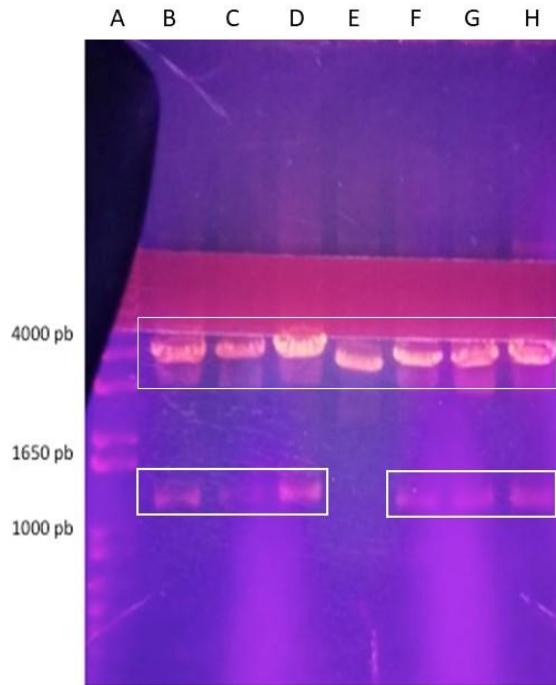


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio de las restricciones con *EcoRI* de los plásmidos obtenidos de las clonas analizadas. Carril A: marcador de masa molecular, del carril B al H plásmidos digeridos.

Transformación de las células de *P. pastoris* X33 con el vector pPICZ α B-*INU*.

Una vez transformadas las células de levadura se dejaron crecer a 30°C por 48 h en medio sólido YPDS con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de zeocina como marcador de selección. Una vez transcurrido el tiempo de incubación de volvieron a plaquear las colonias que crecieron en medio YPDS con 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de zeocina y se incubaron a las mismas condiciones. De las 4 colonias que crecieron, se realizó PCR de colonia usando los cebadores con los que se amplificó el gen que codifica a la inulinasa. Se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y se observó si se amplificó el gen.

Como se puede observar en la Figura 16 las colonias 1, 2, 3 y 4 amplifican el gen de la inulinasa que tiene un peso alrededor de 1650 pb, esto indica que este gen fue incorporado de manera correcta al genoma de *P. pastoris* X33 que originalmente la cepa no contiene ya que en el carril F se observa el control negativo en el cual no se amplificó la secuencia codificante para la inulinasa.

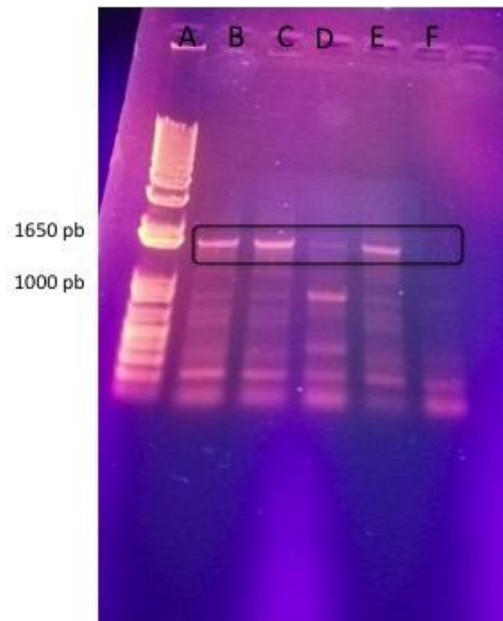


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio de las PCR de colonia de las 4 colonias que crecieron a 250 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de zeocina. Carril A: marcador de masa molecular, del carril B al E PCR de colonias que crecieron en ambas concentraciones

Una vez confirmada la presencia del gen que codifica a la inulinasa en el genoma de *P. pastoris* X33 se realizaron los ensayos de expresión de la proteína recombinante como están indicado en el manual de fabricante.

Expresión de la proteína recombinante

Se hizo crecer las células de la colonia 4 en 20 mL de medio BMGY (Buffer de fosfatos 100mM pH 7.2, peptona 20 g/L, glicerol 5 mL/L, extracto de levadura 10g/L, base nitrogenada libre de aminoácidos) a 28°C, 200 rpm durante 18 h. Una vez transcurrido el tiempo se centrifugó a 8000 rpm por 10 min se retiró el sobrenadante y a las células se adicionaron a 200 mL de medio BMMY (Buffer de fosfatos, peptona, metanol, extracto de levadura) hasta llegar a una densidad de 1 a 600 nm.

Una vez realizado esto se agregó cada 12 h 2 mL de metanol absoluto como inductor de la expresión de la proteína y se dejó crecer a la levadura durante 96 h. Durante todo el crecimiento se monitoreo la expresión de la enzima por medio de la actividad enzimática del sobrenadante ya que la proteína recombinante contiene una señal de secreción usando como sustrato inulina de chicoria.

En la Figura 17, se muestra la actividad enzimática tanto de las células de *P. pastoris* X33 sin transformar, así como de las células transformadas con el vector pPIC α B vacío como controles y la construcción con el gen que codifica a la inulinasa de *K. marxianus* ISO3. Se observó que existe

un aumento en la actividad enzimática del cultivo que contiene la construcción con el gen que codifica a la enzima respecto al tiempo con un máximo de actividad de 72.5 U a las 96h. Además de la determinación de la actividad enzimática se monitoreó la enzima por electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con coomassie.

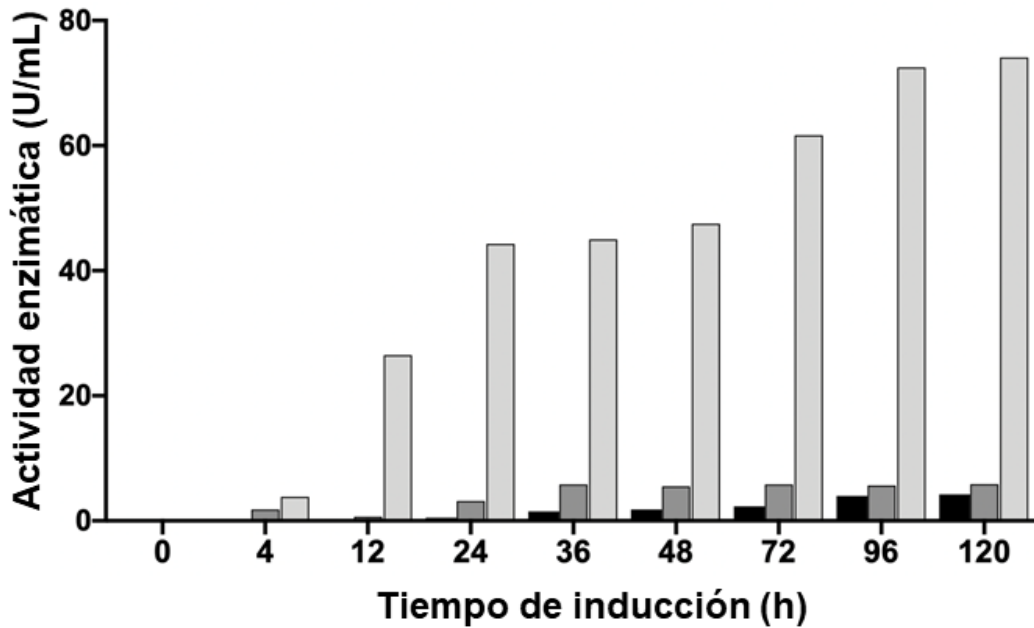


Figura 17. Gráfica de la actividad enzimática del sobrenadante a los diferentes tiempos de crecimiento de la levadura *P. pastoris* X33 en presencia del inductor metanol. Las barras negras representan la actividad del sobrenadante de las células sin vector, en barras gris oscuro la actividad del sobrenadante de *P. pastoris* X33 transformada con el vector vacío y en gris claro la actividad enzimática del sobrenadante de la levadura transformada con la construcción.

En la Figura 18 se observa el seguimiento de la cinética de expresión de la proteína del tiempo cero hasta las 96 h. En esta imagen se observa que la enzima no está presente en al inicio del crecimiento y que comienza a aumentar a partir de las 24 h del crecimiento.

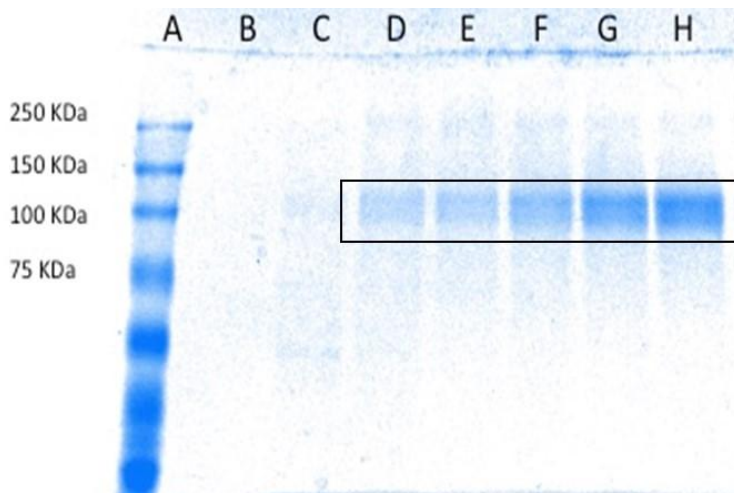


Figura 18. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % teñido con Coomassie de la expresión recombinante de la enzima de *K. marxianus* ISO3 usando el sistema de *P. pastoris*. Carril A: marcador de masa molecular, del carril B al H son las muestras de los sobrenadantes de las horas 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 respectivamente.

Además de esto se aprecia que la enzima tiene dos subunidades cercanas en masa molecular entre los 100 y 125 KDa. Esto es común cuando se utiliza como sistema de expresión a la levadura *P. pastoris* ya que existen reportes en los que se menciona que proteínas que se encuentran glicosiladas al expresarse en este sistema se generan dos proteínas con diferente grado de glicosilación (Rajput, *et al.*, 2018) (Cayetano-Cruz, *et al.*, 2016).

Una vez confirmada la presencia de la enzima y que esta tenía actividad enzimática se decidió montar el proceso de purificación que consistió como primer paso concentrar a la enzima por medio de liofilización del sobrenadante para posteriormente emplear una cromatografía de afinidad como paso de purificación.

Purificación y caracterización de la enzima recombinante

Se realizó la purificación utilizando cromatografía de afinidad, en ella se obtuvo el cromatograma que se muestra en la Figura 19 en el que se observa un solo pico que eluyó a una concentración de 0.2 M de imidazol.

De este pico eluyeron 4 fracciones (f18-f21), a cada uno de ellos se tomaron alícuotas para verificar si presentaban actividad enzima usando como sustrato inulina de chicoria, todas las muestras presentaron actividad.

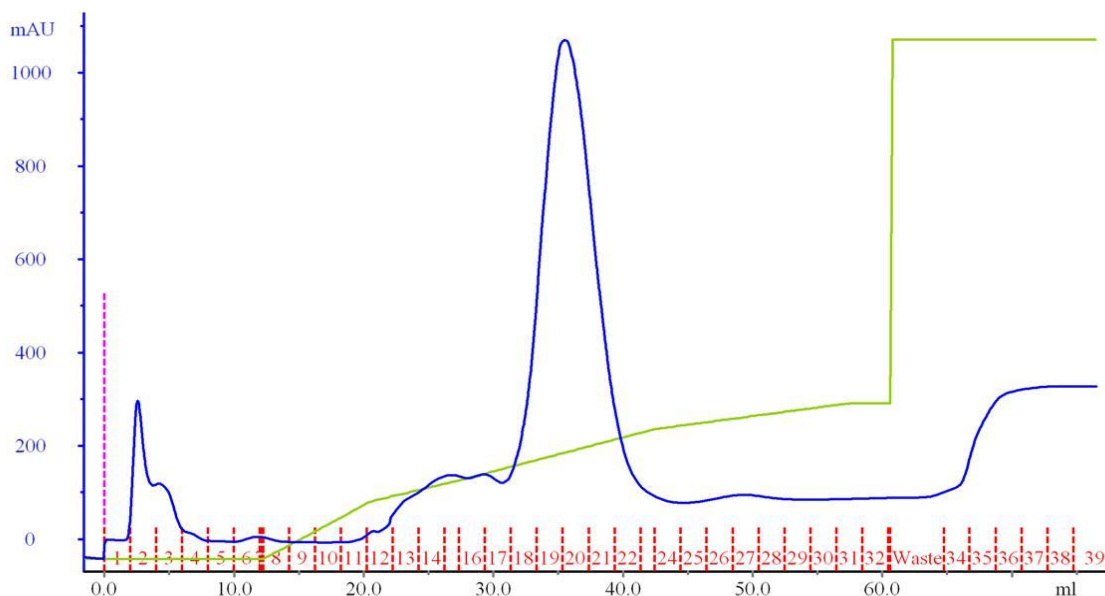


Figura 19. Cromatograma obtenido del paso de purificación por cromatografía de afinidad de la columna His Trap HP de 5 mL del sobrenadante liofilizada y resuspendido en buffer de fosfatos 50 mM pH 7.2 + 100 mM de NaCl + 20 mM de imidazol de la inulinasa recombinante.

El monitoreo de la purificación se llevó a cabo mediante electroforesis SDS-PAGE (Figura 20), se puede observar que en las cuatro fracciones colectadas se tiene la proteína de interés ya que en todas se ve un par de bandas entre 75 a 100 kDa. Una vez obtenida la proteína pura se dosificó 1 mL en tubos de micro centrifuga con 20% de glicerol y se guardó a -80 °C para realizar diversas pruebas.

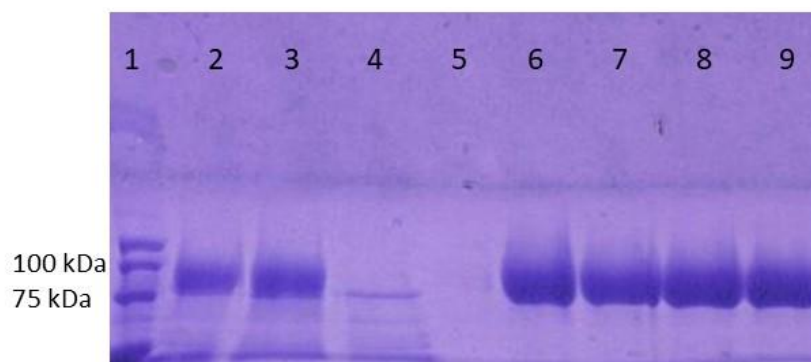


Figura 20. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% teñido con azul de coomassie de la purificación de la inulinasa. Carril 1 marcador de masa molecular, carril 2 sobrenadante, carril 3 sobrenadante concentrado, carril 4 residuo del paso de concentración, carril 5 muestra no retenida en la columna, carril 6 fracción 18, carril 7 fracción 19, carril 8 fracción 20 y carril 9 fracción 21

El cálculo de la masa molecular de la enzima recombinante se realizó por medio de cromatografía de exclusión molecular usando una columna Superdex 200 calibrada, tomando en cuenta el valor del volumen de elución se calculó el peso el cual fue de 259 kDa muy cercano al peso obtenido para la enzima silvestre el cual fue de 256 kDa (Trapala, *et al.*, 2020) y similar al reportado por Arrizon, *et al.* en 2009 que fue de 250 kDa.

Con la proteína pura se realizaron pruebas de dispersión dinámica de luz (DLS) para probar si se tenía una proteína mono dispersa. En la Figura 21A se observa el resultado obtenido de la dispersión dinámica de luz a la muestra de la enzima recombinante en la cual se tiene un solo pico con un diámetro hidrodinámico de 11.76 nm. Por otro lado, en la Figura 21B se observa la comparación de los resultados de DLS entre la enzima silvestre que se muestra en color azul y la proteína recombinante en color rojo. Se observa que ambas proteínas son similares ya que la enzima silvestre tiene un diámetro de 11.62 nm mientras que la recombinante es de 11.76 nm. Al comparar con la literatura se ha reportado que la inulinasa de *K. marxianus* tiene un diámetro hidrodinámico de 12 nm muy cercano al valor obtenido tanto para la proteína silvestre como para la recombinante (Artyukhov, *et al.*, 2013, Trapala, *et al.*, 2020).

Esta pequeña diferencia se podría deber a la desviación estándar que tiene el equipo al realizar las determinaciones. Estos resultados indican que la enzima recombinante obtenida en este trabajo está pura y que únicamente existe una población ya que se tiene una señal mono dispersa.

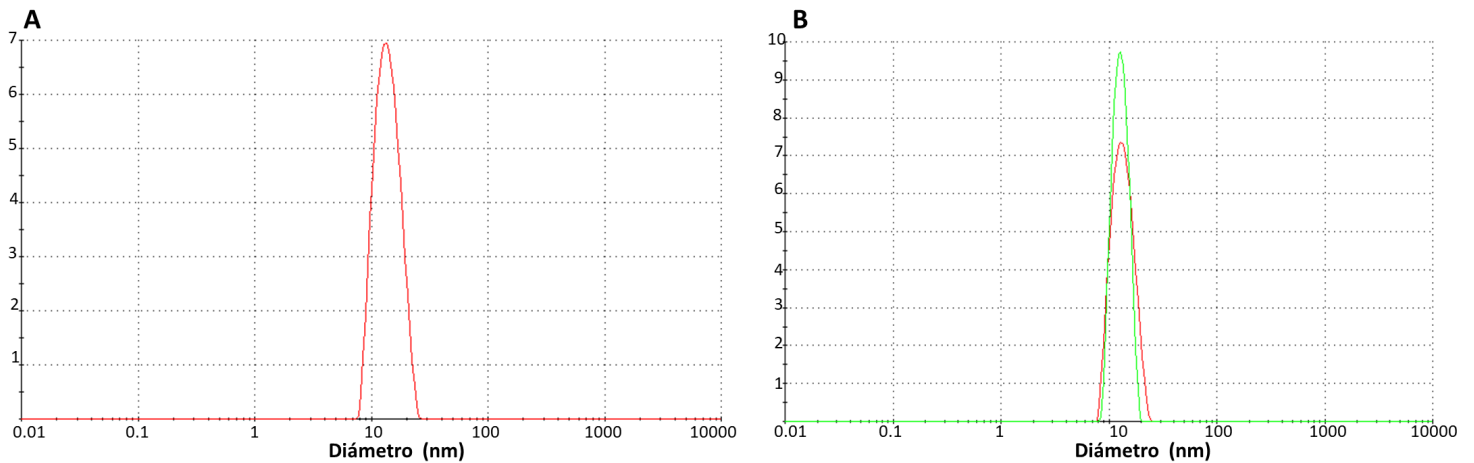
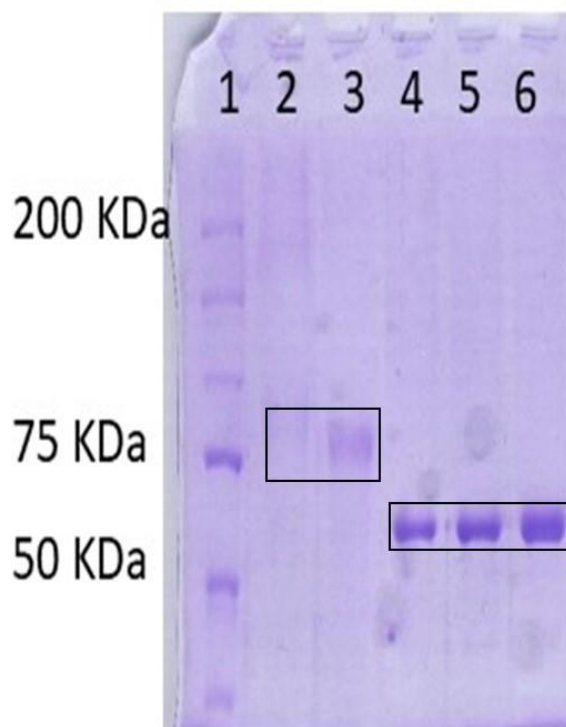


Figura 21. A: dispersión dinámica de luz de la inulinasa recombinante a 25 °C. B: en color azul enzima silvestre en rojo inulinasa recombinante ambas a 25 °C.

Ensayos de desglicosilación

Previamente se había determinado que la enzima obtenida de la fuente natural contenía glicosilaciones tipo N de N-acetil glucosamina con manosa. Se realizaron diferentes ensayos de desglicosilación con la finalidad de remover la mayor cantidad de carbohidratos unidos a la proteína. Se emplearon 3 enzimas, endoglicosilasa H, manosidasa y PNGasa F con la idea de probar cual lograría retirar una mayor cantidad de carbohidratos y nos permitiría obtener una muestra homogénea. La enzima que mostró mejores resultados fue la PNGasa F ya que removió la mayoría de los carbohidratos compuestos por n-acetil glucosamina y manosa. En la Figura 22, se observa del carril 4 al 6 una banda homogénea de un peso entre 50 a 75 kDa producto de la desglicosilación de la inulinasa recombinante

Además de esto también se comprueba que las dos poblaciones muy cercanas en masa molecular observadas al purificar la inulinasa recombinante son debido a cambios en el grado de glicosilación que produce *P. pastoris*.



Caracterización cinética de la inulinasa recombinante de *K. marxianus* ISO3

Como primer paso de la caracterización cinética de la enzima recombinante, se decidió estudiar y comparar su comportamiento con la enzima silvestre con glicosilaciones a diferentes condiciones de pH (2.5 a 6.5) y temperatura (30 a 70°C).

Lo primero que se analizó fue el efecto del pH en la actividad enzimática con los tres sustratos de trabajo a una temperatura fija la cual fue 50°C ya que es la temperatura óptima empleada en la enzima silvestre. En la Figura 23A-C se muestra la actividad enzimática con los diferentes sustratos (inulina de chicoria, agavina y sacarosa respectivamente). En los tres casos el máximo de la actividad se encuentra a un pH entre 4.5 y 5.5, este comportamiento es muy similar al visto en la enzima silvestre ya que el máximo de actividad se encuentra en el mismo intervalo. Esta enzima al igual que otras enzimas reportadas de *K. marxianus* presentan un valor máximo de hidrólisis de inulina de chicoria entre 4.5 a 5.5 de pH. (Shing *et al.*, 2007, Arrizon *et al.*, 2011, Trapala, *et al.*, 2020)

Por otro lado, al comparar la actividad de la enzima recombinante con la enzima silvestre frente a los tres sustratos y a un intervalo de pH más bajo, 3 y 3.5, se observó que, a diferencia de la enzima silvestre, la enzima recombinante presentó actividad a estos pH's (figura 23).

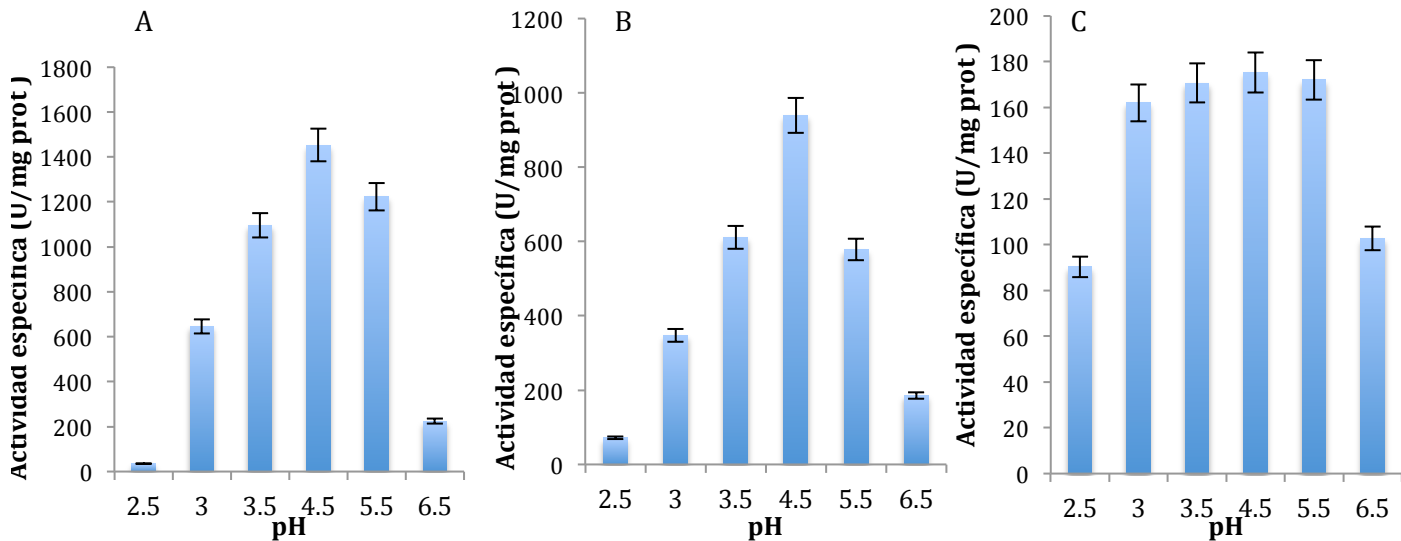


Figura 23. Actividad específica de la enzima recombinante a diferentes pH a una temperatura de 50°C empleando distintos sustratos a una concentración del 1% m/v. En A se observa el comportamiento con inulina de chicoria, en B con inulina de agave y en C sacarosa.

En la Figura 24, se observa la actividad específica de la enzima recombinante frente a los tres sustratos empleados en este proyecto a diferentes temperaturas que van desde los 30°C hasta los 70°. En el panel A la hidrólisis de inulina de chicoria en el B la hidrólisis de agavina y en el C la reacción con sacarosa. Todas las reacciones se llevaron a cabo a pH 4.5 el cual fue el mejor en todos los casos.

Se observa que para las dos inulinas se tiene una actividad máxima a una temperatura de 50°C la misma temperatura que presenta la enzima silvestre. Respecto a la reacción con sacarosa se observa que tiene una actividad muy similar entre los 50°C y los 60°C, esto comparado con los datos obtenidos en la proteína silvestre son similares ya que en este caso el máximo de actividad se encontró a los 60°C.

Al comparar estos resultados con los encontrados en la literatura se observa un comportamiento similar ya que se tiene reportado un máximo de actividad entre los 50-55°C por Singh *et al.*, 2007, Treichel *et al.*, 2011.

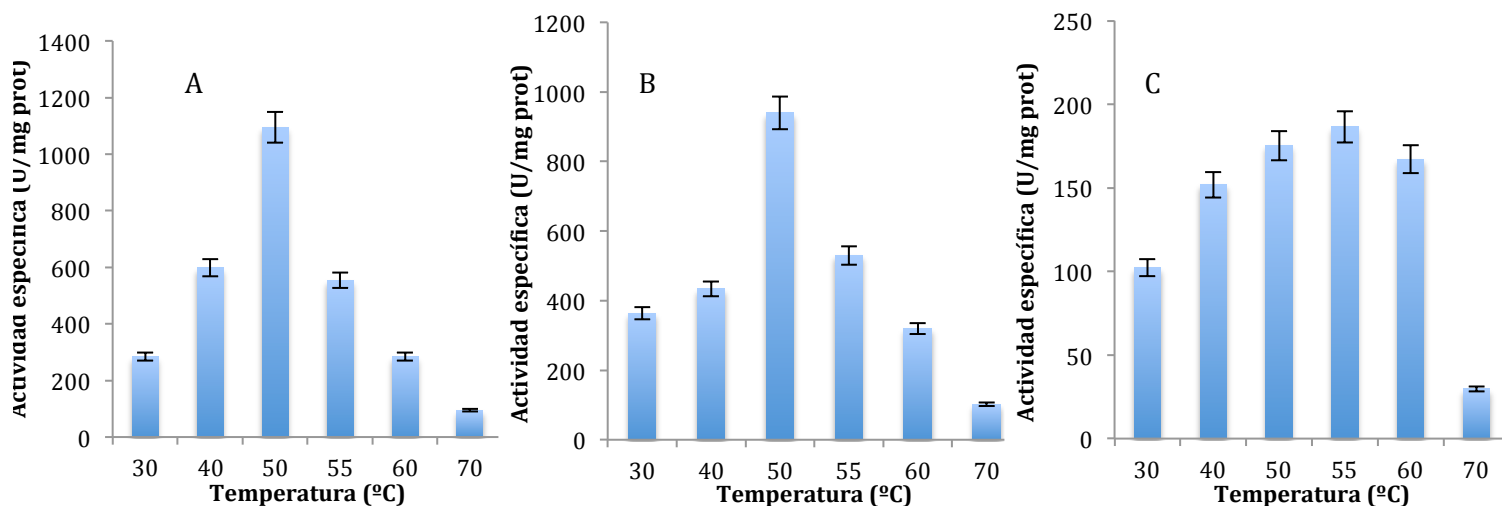


Figura 24. Actividad específica de la enzima recombinante a diferentes temperaturas a pH 4.5 empleando distintos sustratos a una concentración de 1% m/v. En A se observa el comportamiento con inulina de chicoria, en B con inulina de agave y en C sacarosa.

Tomando en cuenta estos valores se decidió tomar las mejores condiciones de reacción para llevar a cabo los experimentos para determinar las constantes catalíticas de la enzima recombinante los cuales se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Mejores condiciones de reacción para la hidrólisis de inulina de chicoria, agavina y sacarosa empleando la inulinasa recombinante.

Sustrato	Inulinasa Silvestre (Inu-ISO3)		Inulinasa recombinante (rInu-ISO3)	
	pH	Temperatura (°C)	pH	Temperatura (°C)
Inulina de chicoria	4.5	50	4.5	50
Agavina	5.5	50	4.5	50
Sacarosa	4.5	60	4.5	55

Se emplearon las mejores condiciones de reacción y diferentes concentraciones de sustrato que para el caso de la inulina de chicoria van de 0.5 mM hasta 8 mM, para la agavina de 1.85 mM hasta 14.8 mM y para sacarosa de 29.21 mM hasta 292.1 mM. Los valores máximos de concentración para los fructanos fueron tomando como consideración la solubilidad de los mismos.

En la Figura 25 se observan las curvas de saturación para cada sustrato, en A se presentan los datos obtenidos para la inulina de chicoria, en B la agavina y en C la sacarosa. A partir del ajuste de los datos a la ecuación de Michaelis-Menten se obtuvieron las constantes cinéticas para cada sustrato.

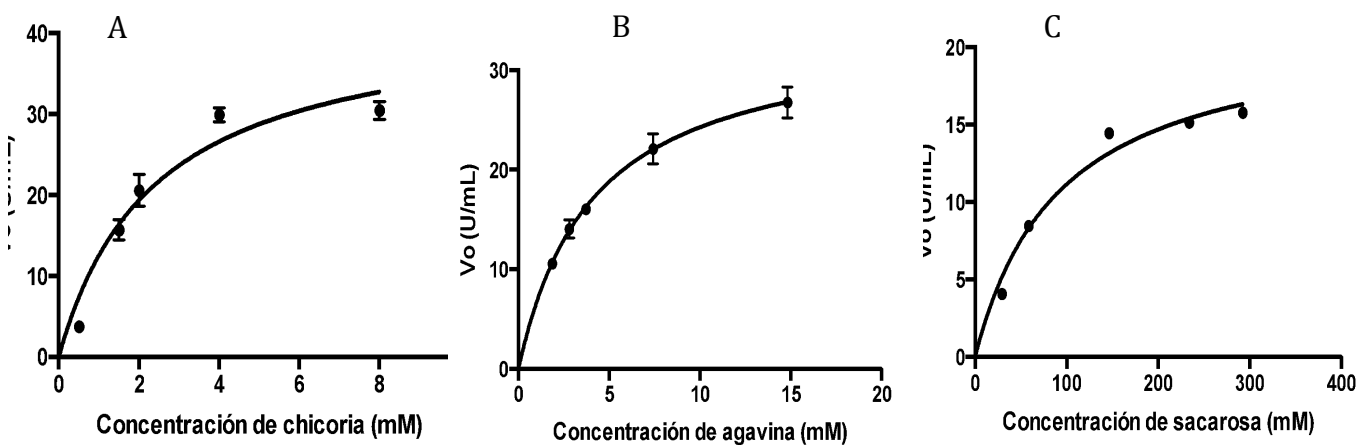


Figura 25. Curvas de saturación de la inulinasa recombinante de *K. marxianus* ISO3 en presencia de los tres sustratos ajustados por la ecuación de Michaelis-Menten (línea negra). En A se observa el comportamiento con inulina de chicoria, en B con inulina de agave y en C sacarosa. Cada ensayo fue realizado por triplicado

En la Tabla 4 se observan los valores de K_m , k_{cat} y eficiencia catalítica para cada sustrato, así como los datos obtenidos para la enzima silvestre.

Tabla 4. Parámetros cinéticos para la inulinasa recombinante y silvestre de *K. marxianus* ISO3

Sustrato	(Inu-ISO3)			(rInu-ISO3)		
	K_m (mM)	k_{cat} (S^{-1})	k_{cat}/K_m	K_m (mM)	k_{cat} (S^{-1})	k_{cat}/K_m
Inulina de chicoria	3.9 ± 1.2	1380 ± 45.4	351 ± 17.6	2.4 ± 0.5	1636 ± 3.9	684 ± 34.2
Agavina	11.8 ± 1.7	339 ± 5.7	28.8 ± 1.4	4.1 ± 0.4	1345 ± 1.3	328 ± 16.4
Sacarosa	97.3 ± 17.8	414 ± 5.0	4.2 ± 0.2	93 ± 16.2	845 ± 1.4	9.1 ± 0.5

Como se puede observar en todos los sustratos se tuvo una disminución del valor de K_m respecto al obtenido para la enzima silvestre, el más significativo de ellos fue el obtenido para la inulina de agave que indica que es más de 50% más afín que para la proteína silvestre.

Estos resultados impactan en la eficiencia catalítica ya que para el caso de la inulina de chicoria y sacarosa prácticamente se duplicaron, mientras que para la agavina aumentó en un orden de magnitud. Estos cambios no tienen un origen claro ya que la proteína tiene la misma secuencia de aminoácidos y un ambiente similar a la inulinasa silvestre. Sin embargo, una posible explicación es que la enzima recombinante se le adicionó en el extremo carboxilo una cola de histidinas las cuales podrían interactuar con el carbohidrato a través de interacciones tipo π . Otra posible explicación es la diferencia de glicosilaciones debido a la cepa de expresión. Por ejemplo, en la β -fructofuranosidasa de *Rhodotorula dairenensis* una proteína de la familia GH32 se expresó en un sistema recombinante modificando las glicosilaciones en la enzima recombinante, estos cambios reorientaron partes de la proteína que modificaron la actividad (Jiménez-Ortega E., et al., 2022).

Este mismo fenómeno podría estar sucediendo en la inulinasa recombinante re diseñando partes de la enzima que podrían provocar cambios en la actividad.

Dinámica molecular

Dinámica molecular de la inulinasa silvestre

Partiendo de la estructura ya cristalizada de la inulinasa de *K. marxianus* depositada en el PDB con código 6JOT en 2020, se realizó un BLAST con nuestra secuencia con un resultado del 98% de identidad, los cambios presentes en la secuencia de la proteína de estudio se encuentran en el extremo amino los cuales son: Ala4Tyr, Gly5Ser, Ile9Pro, Arg10Leu, Gly11Ala, Arg12Gly, Ser13Val, Gln14Ser, Cys15Ala. Estos cambios al parecer pertenecen a una región desestructurada de la proteína ya que en el cristal no se logra ver la región que va del aminoácido 1 al 31. Al analizar esto se decidió usar este modelo para llevar a cabo dinámicas moleculares del complejo enzima-sustrato colocando el ligando en la posición -1 reportadas en otros complejos como el reportado por Sainz-Polo *et al.*, en 2012 o Nagem *et al.*, 2004.

Se extrajeron las coordenadas de la inulina del complejo 3U14 y de la sacarosa del complejo 2ADD depositados en el PDB. Por último, se realizó la molécula de agavina usando el programa Spartan, estas tres moléculas fueron usadas como sustratos para realizar las simulaciones.

Todos los ligandos fueron parametrizados usando el programa Antechamber y se generaron los archivos de topología y de coordenadas por medio del programa Acypype para que compartieran las mismas características que el campo de fuerza de amber que se implementó durante la dinámica.

Se decidió hacer todas las dinámicas usando el programa Gromacs empleando las siguientes características, campo de fuerza amber 99sb, el modelo de agua SPCE, un tamaño de caja cúbica de 1.4 nm, una temperatura de 323 K, una atmósfera de presión y durante un intervalo de tiempo de 100 ns.

Una vez transcurrida la dinámica se verificó que la proteína, el ligando y el complejo fueran estables durante toda la simulación por medio del cálculo del RMSD respectivamente como se muestra en la Figura 26. A partir del análisis de estas gráficas se decidió realizar el cálculo de energía de unión en los intervalos de tiempo donde es más constante el RMSD en las tres gráficas, por ejemplo, en la Figura 26 se realizó el cálculo entre 10 a 20 ns ya que en ese intervalo el RMSD fluctúa 0.1 nm sobre todo en el complejo enzima-sustrato. El mismo análisis se realizó en todos los complejos analizados.

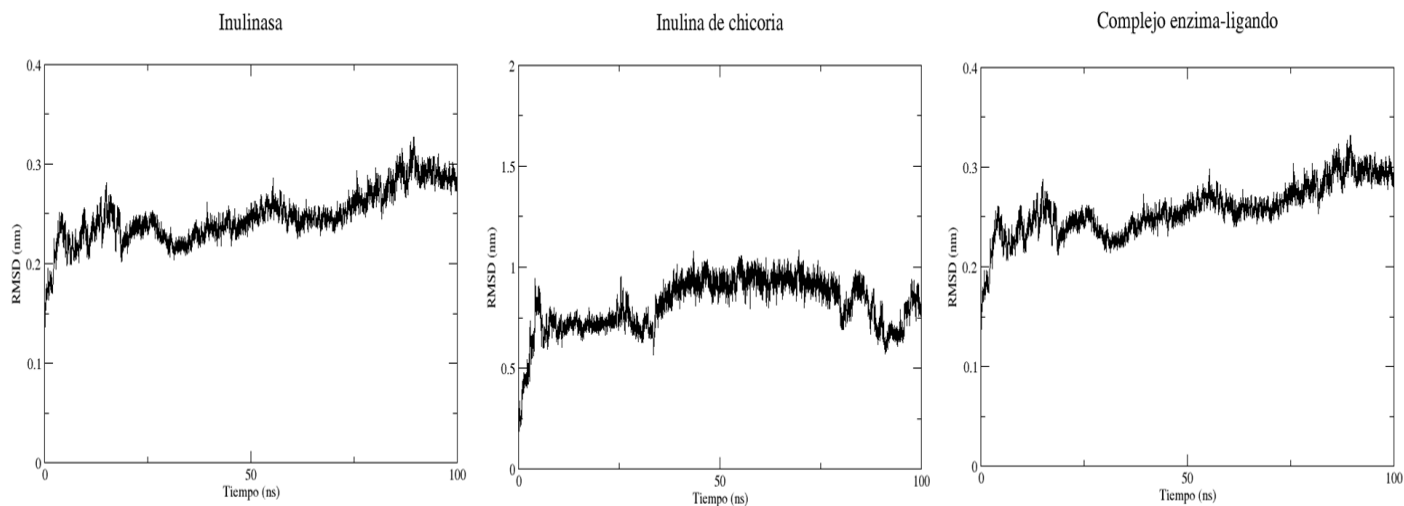


Figura 26. Gráfica de RMSD durante el transcurso de la dinámica. En A) se muestra la fluctuación que tiene la proteína, en B) el ligando (inulina de chicoria) y en C) el cambio que sufre el complejo inulinasa-inulina de chicoria.

Una vez realizado esto se procedió a realizar el cálculo de energía de unión usando una herramienta accesoria del programa Gromacs llamada mecánica molecular de superficie de área de Poisson-Boltzmann (MM-PBSA por sus siglas en inglés). Usando esta herramienta se puede determinar posición por posición que aminoácido de la proteína aporta una mayor energía de unión y analizar, basado en datos experimentales de complejos similares, que tan relevante pueda ser esta interacción. El cálculo de energía de unión se llevó a cabo por duplicado para cada complejo. Los resultados se muestran en la Tabla 5 indican qué aminoácidos tienen una mayor energía de unión para cada complejo. Uno de los aminoácidos catalíticos el Asp 181 tiene un aporte de energía de unión alto debido a las interacciones que deben presentar para realizar la catálisis.

Tabla 5. Energía de unión de los diferentes aminoácidos que interaccionan con el ligando.

Aminoácidos	Energía de unión (kJ/mol) del complejo con agavina	Energía de unión (kJ/mol) del complejo con inulina de chicoria	Energía de unión (kJ/mol) del complejo con sacarosa
Trp79	-24.85 ± 5.69	-24.08 ± 0.95	-9.59 ± 1.17
Phe113	-9.53 ± 2.41	-12.98 ± 2.25	-9.37 ± 1.97
Ser114	-5.40 ± 1.2	-2.64 ± 0.83	-4.90 ± 0.01
Asp181	-4.00 ± 1.9	-4.41 ± 0.40	-12.33 ± 2.48
Gln236	-1.80 ± 0.1	-2.17 ± 1.06	0.02 ± 0.01
Trp335	-11.47 ± 3.13	-9.72 ± 2.20	-10.82 ± 3.13
Gln339	-4.75 ± 1.97	-0.07 ± 0.01	-0.05 ± 0.01

Por otro lado, hay aminoácidos cuyo aporte de energía se observa en los tres complejos analizados como son: el Trp79, Phe113, Trp335. De estos aminoácidos las posiciones Phe113 y Ser114 se encuentran conservados en diferentes complejos como el de la fructofuranosidasa de *S. occidentalis* (3U14) o el de la exoinulinasa de *A. awamori* (1Y9G) en la posición -1. Se ha reportado en algunas enzimas de esta familia que estos aminoácidos al ser modificados producen una

disminución en la catálisis entre el 20 al 50 por ciento debido a que estabilizan y orientan al anillo de fructosa (Álvaro-Benito. *et al.*, 2012). Debido a esto se modificó uno de estos aminoácidos para ver si tiene el mismo efecto que en otras proteínas ya reportadas.

Existen aminoácidos que sólo se observan en un complejo determinado y podrían ser relevantes en la unión para cada sustrato como son; el Gln339 en el complejo con agavina y la Gln236 en el complejo con la inulina de chicoria.

Estos aminoácidos fueron analizados en otras proteínas pertenecientes a la misma familia de glicosilhidrolasas 32 que se encuentran depositadas en el Protein Data Bank, estas estructuras fueron alineadas con el cristal de la inulinasa de *K. marxianus* para comparar.

Al contrastar el aminoácido Gln236 en otras estructuras reportadas, se observa que esta es una posición variable. Cuando la inulinasa de *K. marxianus* ISO3 se alinea con la exo inulinasa de *A. awamori* (1Y9G) en lugar de tener una Gln, esta proteína tiene en esa posición una Val como se puede observar en la Figura 27. También hay cambios en esta posición cuando compara con la β furanosidasa (3PIJ) de *Bifidobacterium longum* ya que se tiene una Met en lugar de Gln. Se tiene un caso similar con la invertasa de *Thermatoga marítima* ya que en esta posición se tiene Glu.

Se observó que el aminoácido Gln339 que interacciona con el fructano en la posición +3, también presenta variación al realizar una comparación con otras proteínas ya reportadas en el PDB.

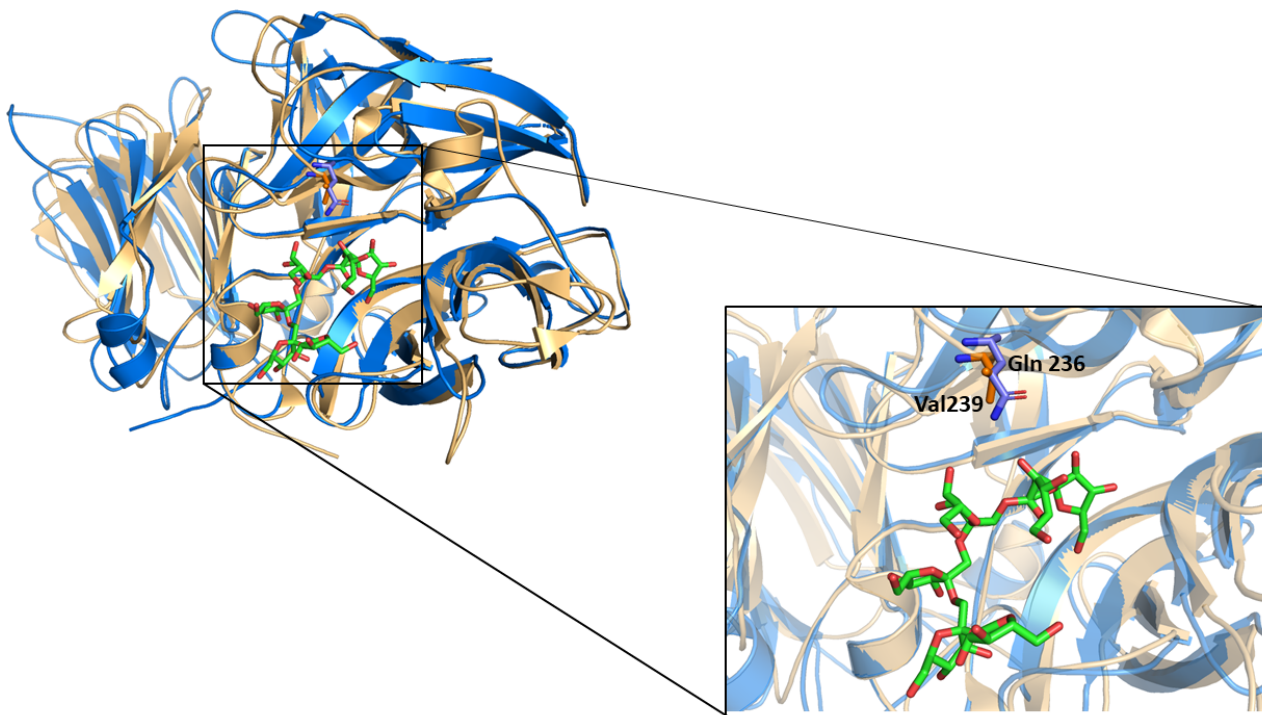


Figura 27. Superposición de las estructuras tridimensionales de la exo inulinasa de *K. marxianus* (azul) (6J0T) con la exo inulinasa de *A. awamori* (dorado) (1Y9G). En el acercamiento se observa en sticks de color verde y rojo a la inulina mientras que se superpone el Gln 236 de *K. marxianus* (sticks en color azul y rojo) con la Val 239 de *A. awamori* (sticks en dorado y azul).

Como se observa en la Figura 28, al alinear la inulinasa de *K. marxianus* con la endo inulinasa de *A. ficcum* (3RWK) en la posición 339 hay un cambio de asparagina por serina. Al comparar con otras estructuras también se aprecian cambios en la misma posición como es el caso de la invertasa de *S. cerevisiae* (4EQV) que presenta Ala o bien la invertasa de *T. marítima* (1UYP) que tiene Glu.

Debido a los cambios que se presentan en ambas posiciones antes mencionados y al aporte que dan estos aminoácidos según el cálculo de energía de unión que se evaluó la modificación por Ala en la Gln 236 como la 339 por medio de la determinación de los parámetros cinéticos.

Otra posición que podría ser relevante es el Trp79, ya que al realizar el cálculo de energía de unión en todos los complejos es el aminoácido que presenta la mayor energía de unión como se muestra en la Tabla 5. Cabe resaltar que tanto en los complejos de agavina como el de inulina de chicoria ambos valores de energía de unión son muy similares (-24.85 vs -24.08 kJ/mol) hay una gran diferencia con el de sacarosa que es de -9.59 kJ/mol. Esto posiblemente podría representar que el Trp79 podría ser relevante para estabilizar a los fructanos. Este aminoácido tiene una interacción tipo stacking en las posiciones +2 y +3 del carbohidrato como se observa en la Figura 29 en la cual se puede ver el complejo obtenido de la dinámica molecular entre la inulinasa y la agavina.

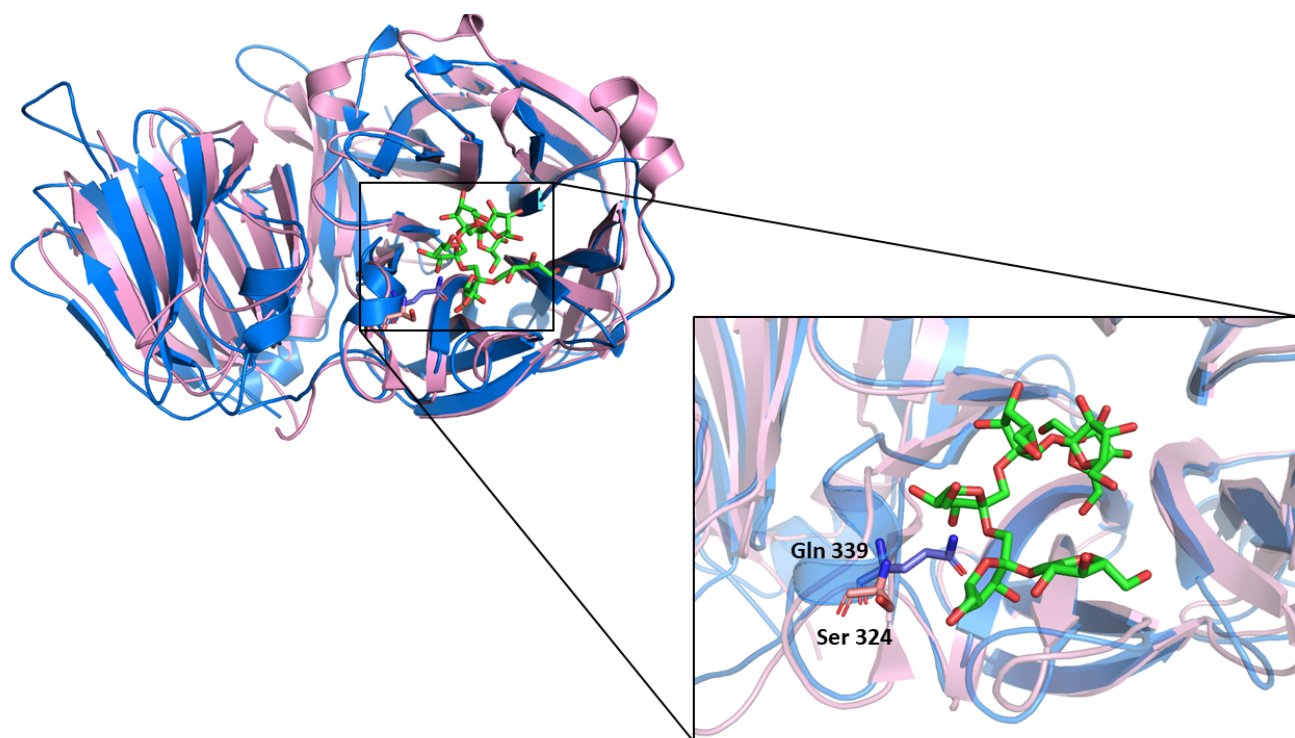


Figura 28. Superposición de las estructuras de la exo inulinasa de *K. marxianus* (azul)(6J0T) con la endo inulinasa de *A. ficcum* (rosa) (3RWK). En el acercamiento se observa en sticks de color verde y rojo a la inulina mientras que se superpone el Gln 339 de *K. marxianus* (sticks en color azul y rojo) con la Ser 324 de *A. awamori* (sticks en rosa y rojo).

Al comparar a la inulinasa con otras proteínas se encontró que existen algunas posiciones que interaccionan con moléculas de agua y que ayudan a estabilizar el complejo enzima-sustrato. Una de estas posiciones es la Asn 227 en la fructofuranosidasa de *S. occidentalis* que en la estructura cristalina se observa la interacción de este aminoácido con una molécula de agua y la posición +2 en el carbohidrato (Álvaro-Benito, *et al.*, 2012). En esta posición en la inulinasa se encuentra la Thr 235 que también podría estar cumpliendo esta función al estabilizar el complejo con ayuda de una molécula de agua.

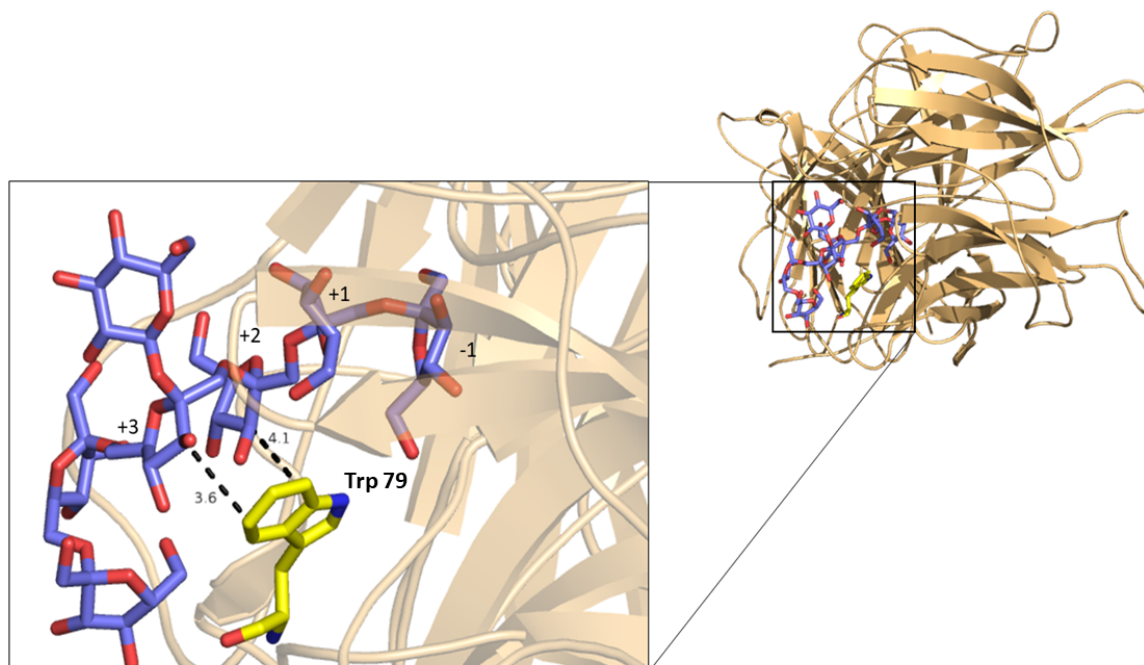


Figura 29. Interacción tipo stacking del complejo obtenido de la dinámica molecular entre el Trp79 de la inulinasa de *K. marxianus* con la agavina (color azul con rojo).

A partir de esto se propusieron algunos aminoácidos a mutar entre ellos lo antes descritos los cuales son Trp79, Phe113, Gln236, Gln339 (Figura 30).

Otro aminoácido que podrían ser relevantes es el Trp334, ya que al realizar los cálculos de energía de unión en todos los complejos presenta un valor importante de energía. Además, al alinear y comparar esta posición en la estructura cristalina de la fructofuranosidasa de *S. occidentalis* se encontró una interacción tipo stacking del Trp314 con la inulina que no fue estudiada a fondo.

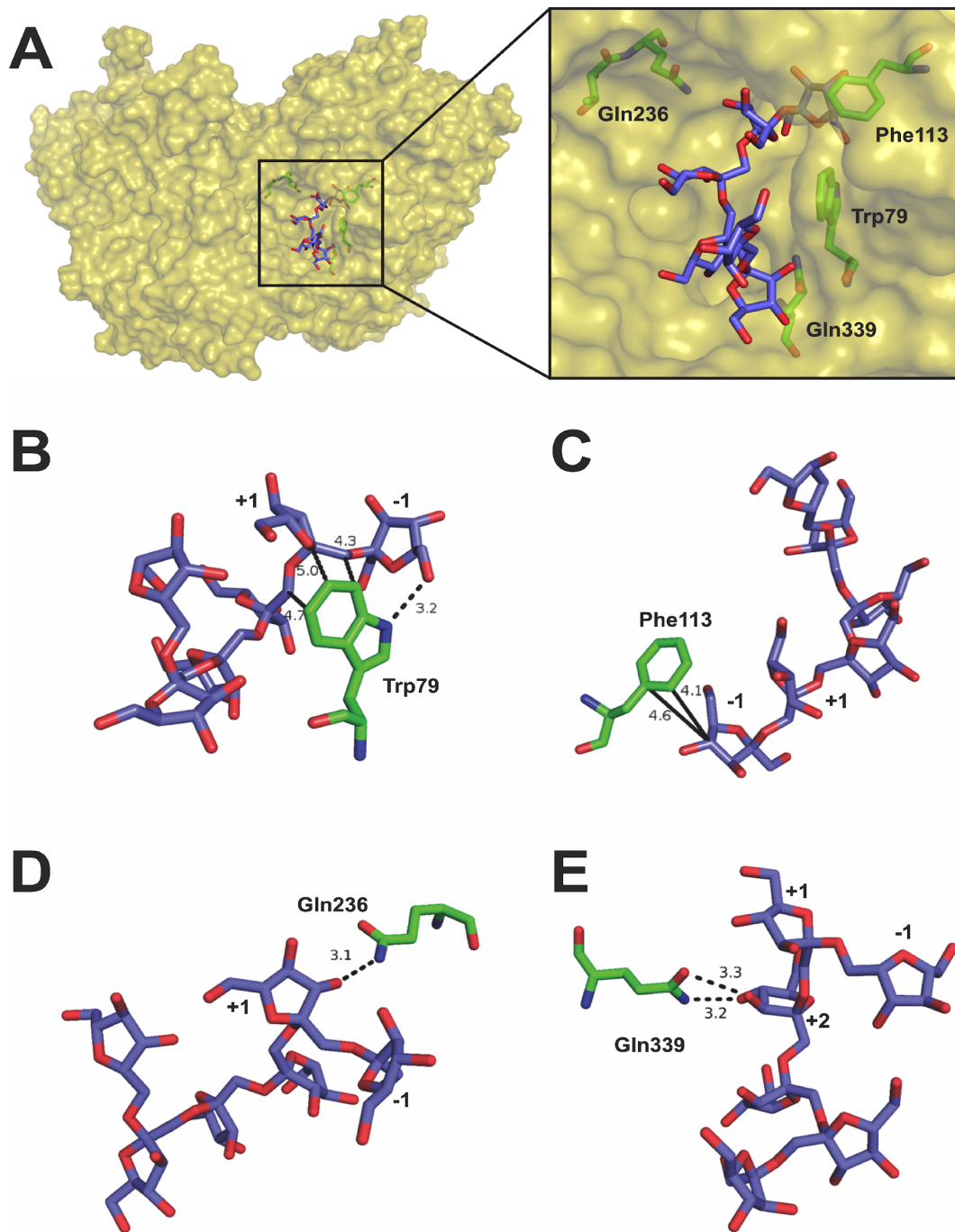


Figura 30. Interacciones de rInu-ISO3 con la inulina de achicoria después de diez ns de dinámica molecular. A) Vista de cerca de las seis unidades de inulina (azul) en la cavidad catalítica de la inulinasa rodeadas por aminoácidos (verde) con mayor energía libre de unión. B) Interacciones de Trp79 con las posiciones -1 y +1 de la inulina. C) Interacción de Phe113 con el extremo fructosilo de la inulina en la posición -1. D) Enlace de hidrógeno entre el anillo en la posición +1 con Gln236. E) Interacción entre la posición 2+ y Gln339 a través de enlaces de hidrógeno.

Dinámicas moleculares de las mutantes propuestas

Una vez seleccionadas las mutantes, se probaron por medio de dinámica molecular el efecto de modificar el aminoácido por alanina en cada uno de los complejos analizados. La mutación del Trp

79 por ala tiene un gran efecto en la energía de unión de esa posición con los tres sustratos analizados (Tabla 6).

Tabla 6. Energía de unión de las distintas mutantes modificadas por alanina con los distintos sustratos evaluados.

Residuo	Complejo					
	Agavina (kJ/mol)		Inulina de chicoria (kJ/mol)		Sacarosa (kJ/mol)	
	Silvestre	Mutante	Silvestre	Mutante	Silvestre	Mutante
Trp79	-24.8 ± 5.7	-3.8 ± 0.20	-24.1 ± 0.9	-4.4 ± 0.20	-9.6 ± 1.2	-2.9 ± 0.2
Phe113	-9.5 ± 2.4	-3.0 ± 0.10	-12.9 ± 2.0	-1.7 ± 0.06	-9.4 ± 1.9	-4.7 ± 0.2
Gln236	0.7 ± 0.1	-0.07 ± 0.01	-2.2 ± 1.0	-1.2 ± 0.01	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1
Gln339	-4.7 ± 1.9	-0.4 ± 0.03	-0.1 ± 0.04	-0.7 ± 0.07	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01

En el caso de los fructanos esta posición tenía un valor cercano a los -24 kJ/mol, cuando se lleva a cabo la mutación por alanina la energía de unión se reduce a un promedio de -4.11 kJ/mol es decir se provoca un decremento del 82 por ciento en la energía de unión. Respecto a esta mutación con el complejo con sacarosa también se observa un decremento en la energía de unión del 70 por ciento que es inferior al de los fructanos. Los resultados sugieren que esta modificación podría provocar un cambio considerable en la afinidad del sustrato y tal vez también podría afectar la catálisis.

Por otro lado, el cambio en la posición 113 tiene un comportamiento similar al del triptófano ya que se ven afectados de mayor manera la energía de unión con fructanos reduciéndose un 68 por ciento y 86 por ciento respecto a la agavina e inulina de chicoria respectivamente. En caso del complejo con sacarosa existe una reducción del 50 por ciento. Ambos aminoácidos presentan reducción en la energía de unión con los tres sustratos analizados en este trabajo.

Uno de los aminoácidos polares propuesto para modificarse fue la glutamina 236, este aminoácido solo presentó energía de unión con la inulina de chicoria. Cuando se modificó y se llevó a cabo el cálculo de energía se observó que se redujo en un 41 por ciento. En los otros complejos analizados, esta mutación no presentaba cambios considerables en el valor de energía.

Otro aminoácido polar mutado fue la Gln 339, esta posición se encuentra más lejana dentro de la cavidad catalítica. Debido a esto es probable que solo los fructanos interacciones en esta posición como es el caso de la agavina que presento un valor de energía de unión de -4.75 kJ/mol en la enzima silvestre y -0.44 kJ/mol en la mutante. Este cambio representa una reducción del 90 por ciento en la energía de unión de esta posición. Los aminoácidos polares analizados solo mostraron cambios en un solo sustrato analizado, en los otros complejos los cambios en la energía no son

apreciables. Por otro lado, todas las mutaciones propuestas tienen una reducción en el valor de la energía de unión entre el ligando y la inulinasa.

Una vez analizadas las diferentes mutantes *in silico*, se construyeron y purificaron las diferentes mutantes propuestas para probarlas.

Construcción y análisis cinético de las mutantes

Usando la metodología Quikchange II site –directed mutagenesis propuesta por la Dra Xia en 2014, se diseñaron los cebadores complementarios para realizar la mutación por medio de la amplificación del plásmido donde se encuentra la secuencia de la inulinasa.

Una vez realizado este proceso se purificó el plásmido y se mandó a secuenciar a la compañía MacroGen.

En la Tabla 7 se muestra que se han obtenido todas las mutaciones planteadas en este trabajo por lo cual se comenzaron ensayos de transformación en células de *P. pastoris* X33.

Tabla 7. Ensayos para la generación de mutantes.

Mutante	Colonias secuenciadas	Colonias positivas
Trp79Ala	5	2
Phe113Ala	6	1
Thr235Ala	6	2
Gln236Ala	5	1
Gln339Ala	5	2

Una vez confirmada la construcción se purificó el plásmido, se linealizó y se realizó la transformación de las células electro competentes de levadura. Realizado este procedimiento, se hicieron crecer en medio YPDS sólido con zeocina como marcador de selección a 30°C de 24 a 72 h.

Cuando se observó el crecimiento de colonias, se tomó un poco de una de las colonias para resembrar en placas de YPD con el doble de zeocina y otro poco de la colonia se usó para llevar a cabo una pcr de colonia usando los cebadores que amplifican la secuencia de la inulinasa de *K. marxianus* ISO3.

En la Figura 31, se observa la electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR, se puede apreciar que del carril 2 al 11 se colocaron muestras de las distintas colonias que crecieron en la placa, en todos los casos se observó al menos una colonia que presentaba el gen de la inulinasa con la mutación deseada.

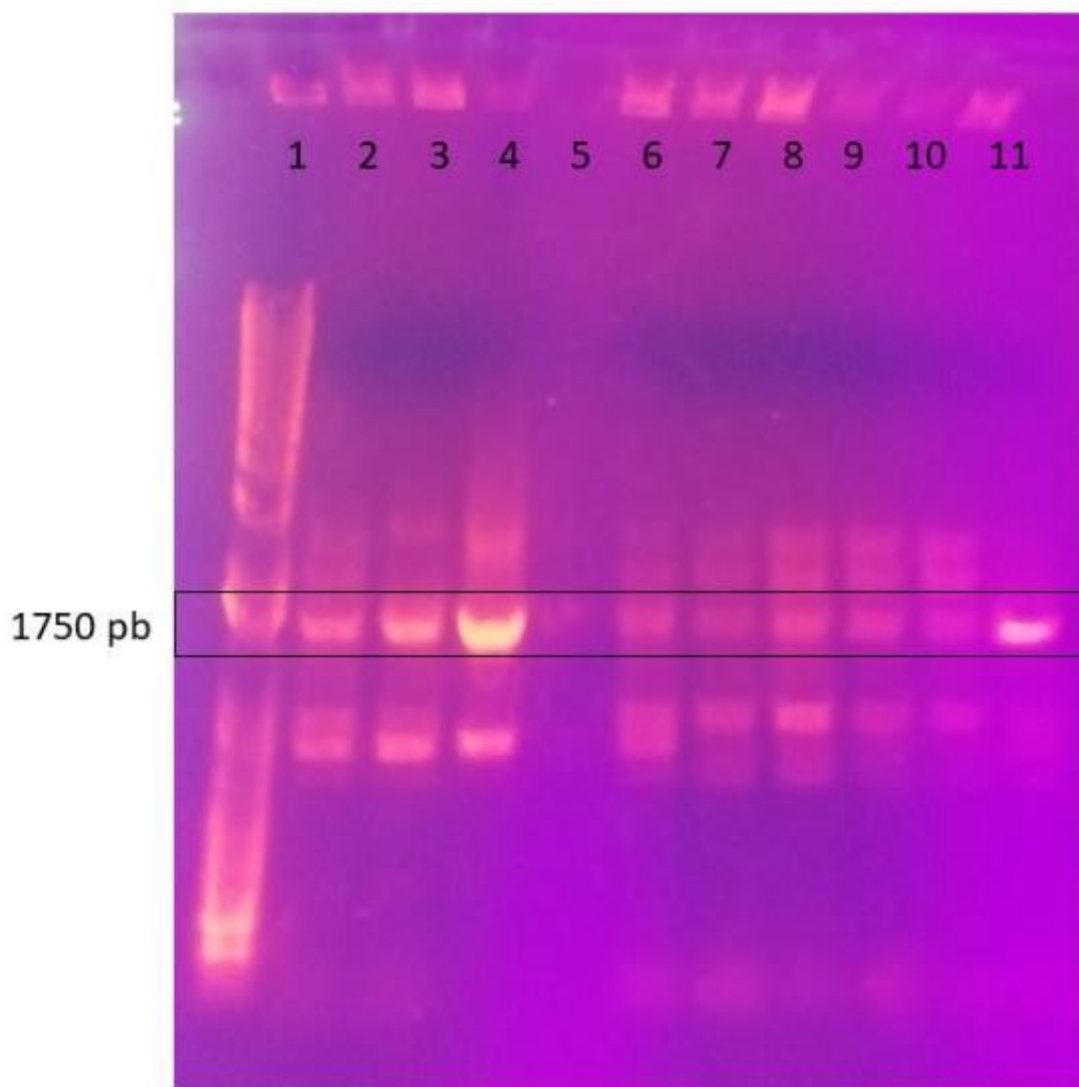


Figura 31. Electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Carril 1 marcador de masa molecular, del carril 2 al 4 mutante Trp79Ala, carril 5 y 6 mutante Phe113Ala, carril 7 y 8 mutante Gln236Ala, carril 9 y 10 mutante Gln339Ala, carril 11 control.

Este mismo procedimiento se realizó en las construcciones restantes confirmando las mutantes Trp79Ala, Phe113Ala, Thr235Ala, Gln236Ala y Gln339Ala.

Una vez confirmadas las cepas mutantes se montaron los experimentos para expresar las proteínas recombinantes, las 5 mutantes se hicieron crecer durante 94 h a 28°C y 200 rpm en medio inducido con metanol al 1 %.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó el medio y se guardó el sobrenadante ya que las proteínas son secretadas al medio. Cada medio se purificó por medio de cromatografía de afinidad usando una columna de 5 mL His Trap fast flow de la marca general electric a un flujo de 2

mL por min en buffer de fosfatos pH 7.2 50 mM para cargar las muestras. Se eluyeron usando un buffer de fosfatos pH7.2, 50 mM más 300 mM de imidazol.

Las muestras fueron colectadas manualmente y fueron dializadas durante 24 h usando buffer de fosfatos pH 7.2 50 mM, posteriormente se cuantificó la proteína presente por medio de la técnica de Bradford.

Tabla 8. Concentración de proteína de las mutantes generadas.

Mutante	Concentración de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Rendimiento de la proteína (mg de enzima/ L de medio de cultivo)
Silvestre	5.80	54.1
Trp79Ala	0.60	6.5
Phe113Ala	0.92	10.2
Thr235Ala	1.60	14.3
Gln236Ala	1.80	20.3
Gln339Ala	2.19	24.7

Como se observa en la Tabla 8 algunas mutantes presentan concentraciones inferiores de expresión como la W79Ala o la Phe113Ala, a pesar de esta baja concentración la cantidad obtenida fue suficiente para determinar los parámetros cinéticos de las proteínas.

Ya cuantificada la cantidad de proteína se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida para verificar la pureza de las proteínas obtenidas cargando en el gel 3 μg de enzima, como se observa en la Figura 32 las enzimas fueron purificadas satisfactoriamente.

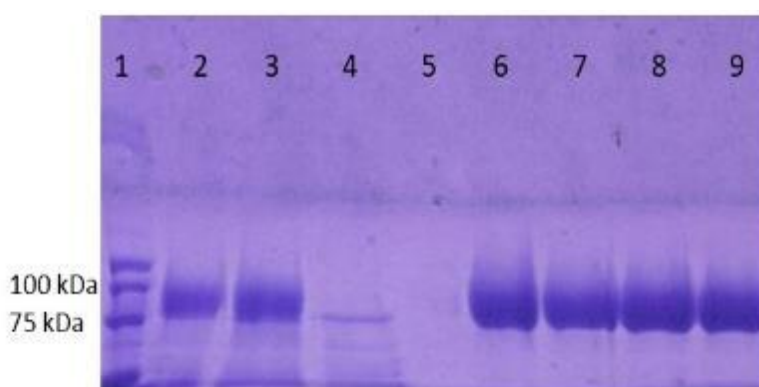


Figura 32. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% teñido con azul de coomassie de las mutantes de la inulinasa. Carril 1 marcador de masa molecular, carril 2 control inulinasa recombinante, carril 3 mutante Trp79Ala, carril 6 mutante Phe113Ala, carril 7 mutante Thr235Ala, carril 8 mutante Gln236Ala y carril 9 mutante Gln339Ala.

Se determinaron los parámetros cinéticos para cada mutante generada usando los tres sustratos que se emplearon en este estudio los cuales fueron inulina de chicoria, agavina y sacarosa. Para cada caso se evaluó primero la actividad enzimática con inulina de chicoria usando la

concentración de proteína que se empleó para la inulinasa silvestre. Una vez analizado este valor se ajustó la cantidad de proteína y el tiempo de reacción para cada mutante.

La mutante Thr235Ala, se usó como control, este aminoácido se encuentra en la cavidad catalítica, es un aminoácido polar, pero en los complejos analizados por dinámica molecular no presentaba valores altos de energía de unión a ninguno de los sustratos analizados. Además, al analizar esta posición en otras estructuras como la de exo inulinasa de *A. awamori* (1y9g) también se tiene el mismo aminoácido y se observa que no logra interactuar con el complejo analizado, por lo que es ideal para usar como control. Al observar las constantes catalíticas obtenidas (Tabla 9) para esta mutación en los tres sustratos estudiados, hay cambios en los valores obtenidos respecto a la enzima silvestre. A pesar de estos cambios los valores se encuentran en el mismo orden de magnitud por ejemplo cuando comparamos la k_{cat} de la hidrólisis de inulina tenemos un valor de $1894 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ de la mutante, mientras que la enzima silvestre tiene un valor de 1636 s^{-1} .

Tabla 9. Parámetros cinéticos de las distintas mutantes obtenidas usando inulina de chicoria, agavina y sacarosa como sustrato a 50°C y pH 5.5.

Enzima	Inulina de chicoria			Agavina			Sacarosa		
	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)
rInu-ISO3	2.4 ± 0.5	1636 ± 3.9	684 ± 34.2	4.1 ± 0.4	1345 ± 1.3	328 ± 16.4	93.0 ± 16.2	845 ± 1.4	9.1 ± 0.5
Trp79:Ala	ND	ND	ND	ND	ND	ND	71.7 ± 12.2	8.5 ± 0.1	0.1 ± 0.0
Phe113:Ala	26.3 ± 1.1	724 ± 25.0	27.6 ± 1.7	11.1 ± 2.9	415 ± 3.6	37.5 ± 3.4	11.1 ± 1.8	415 ± 9.2	37.5 ± 2.6
Thr235:Ala	11.4 ± 3.3	1894 ± 10.0	158 ± 8.0	6.6 ± 1.0	754 ± 16.0	114 ± 0.7	46.7 ± 6.1	321 ± 0.7	6.9 ± 0.6
Gln236:Ala	11.3 ± 2.7	605 ± 13.6	53.5 ± 2.8	36.9 ± 3.5	1339 ± 8.9	36.3 ± 1.8	11.3 ± 1.6	605 ± 13.7	53.5 ± 6.4
Gln339:Ala	8.5 ± 1.6	1484 ± 9.2	173 ± 4.6	7.1 ± 0.9	915 ± 15.0	128 ± 6.0	47.1 ± 2.5	492 ± 9.1	10.5 ± 1.3

La mutación Gln339Ala presentó cambios en la eficiencia catalítica similares al control (Thr235Ala), por ejemplo, la eficiencia catalítica de esta mutación en la hidrólisis de agavina fue de 128 mientras que la proteína silvestre fue de $328 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$. En los casos de la inulina de chicoria y la sacarosa también se puede apreciar una reducción en la eficiencia catalítica al comparar con la enzima silvestre. La disminución en la eficiencia catalítica observada en la mutante Gln339A es del mismo orden de magnitud que la encontrada en la mutante Thr235Ala, es decir, aunque existe un cambio en los valores de eficiencia se mantienen en el mismo orden de magnitud tanto con la mutante control como con la enzima silvestre.

De las mutaciones propuestas la que más generó expectativa fue la Trp79Ala ya que en el análisis de energía de unión era la posición que en los tres complejos estudiados presentaba una mayor energía de unión, por lo tanto, su cambio modificaría en gran medida la eficiencia catalítica de la enzima probablemente afectando más la capacidad de unir al sustrato a través del aumento de la K_m . Esta tendencia observada en los ensayos teóricos se confirmó al obtener los parámetros cinéticos, ya que para esta mutación no fue posible determinar las constantes cinéticas para la hidrólisis de inulina y de agavina debido a la nula actividad enzimática. Se intentaron diferentes pruebas con la intención de determinar los parámetros cinéticos como aumentando hasta 1000 veces la cantidad de proteína y aumentando el intervalo de reacción 30 veces más sin éxito.

Esta mutación fue crítica para la actividad catalítica de la enzima, ya que se perdió la actividad contra la inulina y la agavina, mientras que contra la sacarosa se conservó solo el 2%. Por lo tanto, fue imposible obtener los valores de K_m y k_{cat} para los fructanos analizados en este trabajo. Para determinar los parámetros cinéticos de la sacarosa, fue necesario aumentar más de 200 veces la cantidad de proteína y el tiempo de incubación de la reacción. Sin embargo, la eficiencia catalítica se redujo de 9.1 a 0.1 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, lo que representa una pérdida del 98%. Un comportamiento similar fue reportado por Ma y colaboradores en 2020; ellos mutaron la misma posición, pero por Leucina en la inulinasa de *Kluyveromyces cicerisporus*, y el resultado obtenido fue la pérdida de la actividad catalítica en la hidrólisis de inulina de chicoria y sacarosa (Ma *et al.*, 2020).

Al analizar los resultados obtenidos mediante dinámica molecular, se puede inferir que la mutación Trp79:Ala podría haber provocado la inactivación de la enzima al aumentar el tamaño del bolsillo catalítico debido al cambio en el parche hidrofóbico. Este cambio habría reducido el número de interacciones que estabilizan el complejo enzima-sustrato y, en consecuencia, provocado la falta de actividad observada. En la Figura 33-A, se observa que en el complejo de la enzima silvestre con sacarosa, el Trp79 mantiene una posición a lo largo de la dinámica interaccionando con el sustrato. Cuando analizamos este mismo comportamiento en la mutante Trp79Ala (Figura 33-B), se observa que el sustrato se mueve por la cavidad catalítica a lo largo de dinámica, es decir la sacarosa no se mantiene en la misma posición como pasa con la enzima silvestre debido al aumento en el tamaño de la cavidad y a la pérdida de interacciones en la posición mutada.

Por otro lado, dos mutaciones Phe113Ala y Gln236Ala generaron un aumento en la eficiencia catalítica por la sacarosa en un orden de magnitud con valores de 37.5 y 53.5 respectivamente, comparando con la enzima silvestre que presentó un valor de $9.1 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$.

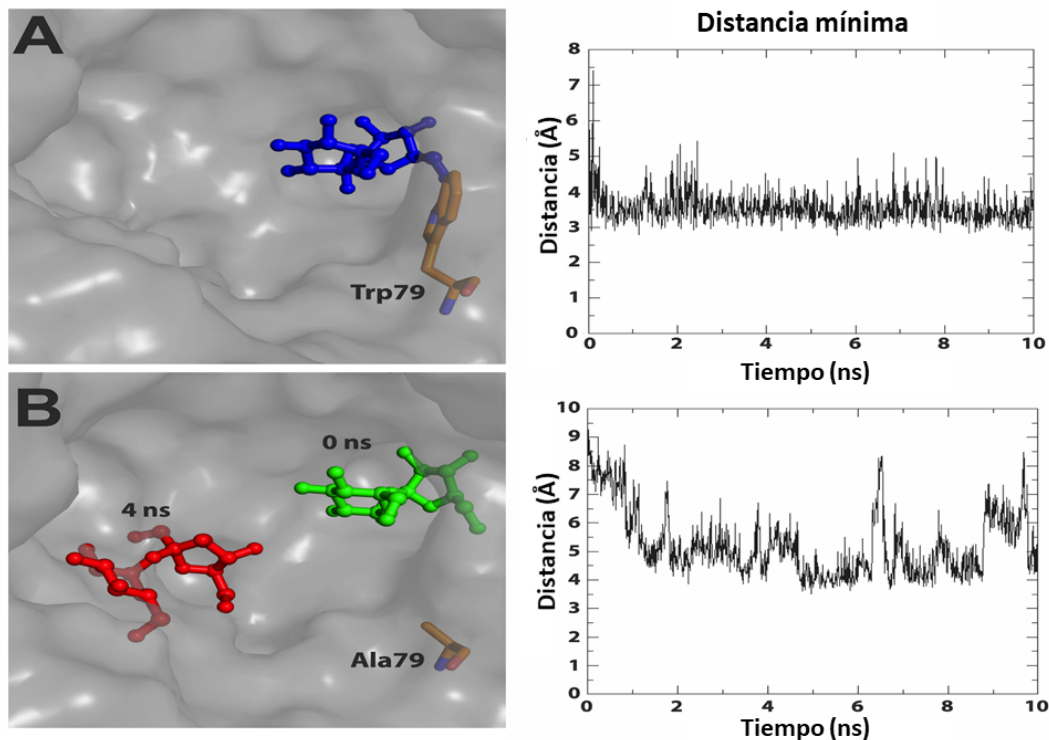


Figura 33. Comparación del bolsillo catalítico del complejo con sacarosa entre rlnu-ISO3 y su mutante Trp79:Ala. A) rlnu-ISO3 con sacarosa (azul) en la cavidad catalítica estabilizada y el gráfico de distancia mínima entre Trp79 y sacarosa a temperatura final (365 K) durante diez ns. B) Mutante Trp79Ala con sacarosa al inicio de la dinámica molecular (tiempo = 0) (verde), sacarosa después de cuatro ns (rojo) y gráfico de distancia mínima entre alanina y carbohidrato.

Este cambio se ve asociado a una reducción del valor de la constante de Michaelis (K_m) que pasó de tener un valor en la inulinasa silvestre de 93 mM a tener para la mutante Phe113Ala un valor de 11.1 mM y para Gln236Ala 11.3 mM. Comparando con los datos teóricos obtenidos se encontró que para la mutación Phe113Ala este aminoácido tiene una energía de unión para inulina de -1.78 kJ/mol , mientras que para sacarosa fue de -4.76 kJ/mol .

Sin embargo, cuando se analizó el efecto de estas mutantes en las constantes catalíticas de los fructanos la tendencia cambia, ya que la eficiencia catalítica para la hidrólisis de inulina de chicoria y agavina cae en un orden de magnitud, pasó de un valor para la enzima silvestre para la reacción con inulina de chicoria de $684 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ a $27.6 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ para la mutante Phe113Ala y $53.5 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ para Gln236Ala. Respecto a la hidrólisis de agavina los valores obtenidos fueron para la enzima silvestre $328 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$, para la mutante Phe113Ala $37.5 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ y para Gln236Ala $36.3 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$.

El complejo de la β -fructofuranosidasa de *S. occidentalis* ha sido objeto de análisis en la literatura, en particular se ha estudiado la posición Gln236 que comparten ambas enzimas. Al sustituir la asparagina por valina en esta posición, se ha observado una disminución en la eficiencia catalítica de la hidrólisis de la inulina de chicoria en dos órdenes de magnitud, este resultado es similar al obtenido en el trabajo de Alvaro-Benito y colaboradores en 2012. (Alvaro-Benito *et al.*, 2012).

Se ha reportado en la literatura que la 1-exohidrolasa de *C. intybus* sufre de inhibición por sacarosa, sin embargo, en la mutante Trp82Leu se reduce la inhibición por sustrato y su actividad catalítica aumenta (Verhaest *et al.*, 2007). En este mismo trabajo mencionan que esta posición podría orientar la molécula de sacarosa generando posiblemente un complejo que inhibe la catálisis. La posición del Trp82 es similar a la Phe113 en rlnu-ISO3.

En otro trabajo, se llevaron a cabo dos mutaciones (Trp y Leu) en Phe113, la misma posición seleccionada en este trabajo, en la inulinasa de *K. cicerisporus*. La primera mutación, Phe113:Trp, provocó un aumento de los valores de Km para inulina y sacarosa, de dos y tres veces respectivamente. En cambio, el valor de Km de la mutante Phe113:Ala de rlnu-ISO3 para la sacarosa disminuyó tres veces en comparación con la enzima silvestre. La segunda mutante, Phe113:Leu, no tuvo actividad hacia la inulina ni la sacarosa en la inulinasa de *K. cicerisporus*.

Se ha reportado en la literatura que para esta familia de enzimas un cambio puntual logra potenciar la actividad catalítica hacía un sustrato. Le Roy en 2007 informó que la mutación Phe233:Asp aumentó la eficiencia catalítica para la sacarosa en la levanasa de *Beta vulgaris*. También se ha reportado que transformaron la invertasa de pared celular de *A. thaliana* en una fructan 1-exohidrolasa cambiando el residuo Asp239 por Ala es decir que favorezca la hidrólisis de fructanos sobre la de sacarosa. En el caso de las mutantes Phe113 y Gln236 realizadas en este trabajo observamos que la inulinasa se vuelve más afín a la sacarosa que a los fructanos como la inulina o la agavina es decir hemos cambiado nuestra enzima de una inulinasa a una invertasa usando alguna de estas dos mutantes.

De las 4 mutantes planteadas en este trabajo obtenidas por la metodología teórica antes mencionada 3 fueron relevantes al momento de analizarlas experimentalmente por lo que el estudio de estos complejos mediante el cálculo de energía de unión usando dinámica molecular muestran que la implementación de estas metodologías resulta provechosa ya que se optimizan recursos y permiten un mejor entendimiento de las interacciones entre proteína-ligando.

Conclusiones

Las simulaciones de dinámica molecular de la inulinasa de *K. marxianus* ISO3 y sus sustratos permitieron encontrar algunos aminoácidos relevantes en el reconocimiento y catálisis de los carbohidratos analizados. Los residuos Trp79 y Phe113 localizados en el parche hidrofóbico y los aminoácidos Thr235, Gln 236 y Gln 339 situados en la cavidad catalítica pero no involucrados directamente en la catálisis fueron mutados por Ala.

Estas mutaciones fueron evaluadas calculando la energía de unión a cada sustrato analizado en este trabajo de forma *in silico* en la proteína silvestre. Los datos obtenidos por las simulaciones mostraron una disminución en la energía de unión de todas las mutantes propuestas.

El efecto más importante fue el ocasionado por la mutante Trp79Ala ya que además del cambio energético aumentaba el tamaño de la cavidad de la proteína provocando una posible pérdida de interacciones con el carbohidrato.

La clonación y expresión de la inulinasa en el sistema de *P. pastoris* mostró que la enzima recombinante es un buen modelo de estudio ya que presenta características similares a la proteína obtenida de la fuente natural.

De las mutantes generadas experimentalmente la Trp79Ala no fue posible calcular los parámetros cinéticos de los fructanos analizados debido a la pérdida de actividad enzimática provocado por la mutación. Además, Phe113:Ala, que según la simulación de dinámica molecular pierde la interacción apilada en la posición +1 con los fructanos, muestra una disminución sensible de nueve veces en la eficiencia catalítica hacia los fructanos y un aumento del mismo parámetro de aproximadamente cuatro veces para la sacarosa, lo que transforma a esta enzima mutante en una invertasa debido a su preferencia de sustrato. En conclusión, nuestro estudio sugiere que las posiciones 79 y 113 son clave en el reconocimiento del sustrato y la actividad de la inulinasa ISO3 de *K. marxianus*, mientras que los residuos polares Thr235, Gln236 y Gln339 también participan en la unión del sustrato, aunque en menor medida.

Perspectivas

Probar experimentalmente la mutación Trp334Ala que indicaba un valor alto de energía de unión en las simulaciones.

Estudiar el efecto de las mutaciones en la reacción de transglicosilación en la obtención de fructooligosacáridos.

Corroborar el efecto de las mutantes mediante la obtención de las estructuras cristalográficas.

Usando dinámica molecular encontrar que mutaciones podrían favorecer el reconocimiento de fructanos ramificados.

Bibliografía

- Abbott, D., & Van Bueren, A. (2014). Using structure to inform carbohydrate binding module function. *Current Opinion in Structural Biology*, 32-40.
- Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvarado, E., Ávila-Reyes, J. A., Uribe-soto, J. N., & González-Valdez, L. S. (2013). The phenols of the genus *Agave* (Agavaceae). *Journal of biomaterials and nanobiotechnology*, 4, 9-16.
- Álvaro-Benito, M., Sainz-Polo, A., González-Pérez, D., González, B., Plou, F., Fernández-Lobato, M., & Snaz-Aparicio, J. (2012). Structural and Kinetic Insights Reveal That the Amino Acid Pair Gln-228/Asn-254 Modulates the Transfructosylating Specificity of *Schwanniomyces occidentalis* β -Fructofuranosidase, an Enzyme That Produces Prebiotics. *The journal of biological chemistry*, 19674-19686.
- Arango, O., Cuaran, G., & Fajardo, J. (2008). Extracción, cristalización y caracterización de inulina a partir de *Yacón* (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl) para su utilización en la industria alimentaria y farmacéutica. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 14-20.
- Arjomand, M. R., Ahmandian, G., Habibi-Rezaei, M., Hassanzadeh, M., Karkhane, A. A., Moosavi-Mosavi-Movahedi, A. A., & Amanlou, M. (2017). The importance of the non-active site and non-periodical structure located histidine residue respect to the structure and function of exo-inulinase. *International journal of biological macromolecules*, 542-549.
- Armenta, S., Moreno-Mendieta, S., Sánchez-Cuapio, Z., Sánchez, S., & Rodríguez-Sanoja, R. (2017). Advances in molecular engineering of carbohydrate-binding modules. *Proteins*, 85, 1602-1617.
- Arrizon, J., Morel, S., Gschaedler, A., & Monsan, P. (2011). Purification and substrate specificities of a fructanase from *Kluyveromyces marxianus* isolated from the fermentation process of mezcal. *Bioresource Technology*, 3298-3308.
- Artyukhov, V., Holyavka, M., & Kovaleva, T. (2013). Structural and functional properties of Inulinases. Ways to regulate their activity. *Molecular biophysics*, 635-644.
- Bhatia, I., & Nandra, K. (1979). Studies on fructosyl transferase from *Agave americana*. *Phytochemistry*, 923-927.
- Bolam, D., Xie, H., White, P., Simpson, P., Hancock, S., Williamson, M., & Gilbert HJ. (2001). Evidence for synergy between family 2b carbohydrate binding modules in *Cellulomanas fimi* xylanase. *Biochemistry*, 2468-2477.
- Boraston, A. (2005). The interaction of carbohydrate-binding modules with insoluble non-crystalline cellulose is enthalpically. *Biochemical Journal*, 479-484.
- Cayetano-Cruz, M., Pérez de los Santos, A., García-Huante, Y., Santiago-Hernández, A., Pavón-Orozco, P., López, V., & Hidalgo-Lara, M. (2016). High level expression of a recombinant xylanase by *Pichia pastoris* cultured in a bioreactor with methanol as the sole carbon source: Purification and biochemical characterization of the enzyme. *Biochemical Engineering journal*, 161-169.
- Chi, Z., Chi, Z., Zhang, T., Liu, G., & Yue, L. (2009). Inulinase expressing microorganismos and applications of inulinase. *Applied microbiology and biotechnology*, 211-220.
- Cid, M., Pedersen, H., Kaneko, S., Coutinho, P., Henrissat, B., Willats, W., & Boraston, A. (2010). Recognition of the helical structure of β -1,4-galactan by a new family of carbohydrate-binding modules. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 35999-36009.
- Cimini, S., Di Paola, L., Giuliani, A., Ridolfi, A., & De Gara, L. (2016). GH32 family activity: a topological approach through protein contact networks. *Plant molecular biology*, 401-410.

- Claessens, G., Van Laere, A., & De Proft, M. (1990). Purification and properties of an inulinase from chicory roots (*Cichorium intybus* L.). *Journal of Plant Physiology*, 35-39.
- CONABIO. (10 de 01 de 2005). *CONABIO*. Obtenido de <http://www.biodiversidad.gob.mx/usos/mezcales/mMapa.html>
- Consejo regulador del tequila. (s.f.). *CRT*. Recuperado el 31 de 05 de 2023, de <https://www.crt.org.mx/EstadisticasCRTweb/>
- Davis, S., Dohleman, F., & Long, F. (2011). The global potential for Agave as a biofuel feedstock. *Global Change Biology*, 68-78.
- Díaz-Montaño, D. (2013). Continuous juice fermentation for producing bioethanol. *Biomass now-sustainable growth and use*.
- Dilipkumar, M., Rajamohan, N., & Rajsimman, M. (2013). Inulinase production in a packed bed reactor by solid state fermentation. *Carbohydrate polymers*, 196-199.
- Dilipkumar, M., Rajsimman, M., & Rajamohan, N. (2014). Optimization, kinetics, and modeling of inulinase production by *K. marxianus* var. *marxianus*. *Preparative biochemistry & biotechnology*, 291-309.
- Dorland, L., Johannis, K., Jonannes, V., & Mallur, S. (1977). Oligosaccharides isolated from Agave veracruz. *Carbohydrate Research*, 275-284.
- Dotsenko, A., Denisenko, J., Zorov, I., Wasserman, L., Semenova, M., Korolev, A., . . . Sinitsyn, A. (2023). Single substitution in a-helix of active center enhanced thermostability of *Aspergillus awamory* exo-inulinase. *Journal of molecular graphics and modelling*, 1-8.
- Gao, J., Yuan, W., Xiang, R., Hou, S., Zhong, S., & Bai, F. (2015). Transcriptional analysis of *Kluyveromyces marxianus* for ethanol production from inulin using consolidated bioprocessing technology. *Biotechnology for biofuels*.
- Gilbert, H., Knox, J., & Boraston, A. (2013). Advances in understanding the molecular basic of plant cell wall polysaccharide recognition by carbohydrate-binding modules. *Current Opinion in Structural Biology*, 669-677.
- Gombert, A., Madeira, J., Cerdán, M., & González-Siso, M. (2016). *Kluyveromyces marxianus* as a host for heterologous protein synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 6193-6208.
- Graciano-Fonseca, G., & Heinzle, E. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79, 339-354.
- Harju, S., Fedosyuk, H., & Peterson, K. (2004). Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n'Grab. *BMC biotechnology*, 4-8.
- Irish, M., & Irish, G. (2000). *Agaves, Yuccas and related plants*. Portland: Timber Press.
- Kochhar, R., Gupta, A., & Kaur, N. (1999). Purification and immobilisation of inulinase from *Aspergillus candidus* for producing fructose. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 27, 549-554.
- Lane, M., & Morrissey, J. P. (2010). *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biology Reviews*, 24, 17-26.
- Lehtio, J., Sugiyama, J., Gustavsson, M., Fransson, L., Linder, M., & Teeri, T. (2003). The binding specificity and affinity determinants of family 1 and family 3 cellulose binding modules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 484-489.

- Leyva-Porras, C., López-Pablos, A., Alvarez-Salas, C., & Pérez-Urizar, J. (2014). Physical properties of inulin and technological applications. *Polysaccharides*, 1-22.
- Lopez, M., Mancilla-Margalli, N., & Mendoza-Díaz, G. (2003). Molecular structure of fructans from agave tequilana weber var. azul. *Journal of agricultural and food chemistry*, 7835-7839.
- Ma, J., Li, T., Tan, H., Liu, W., & Yin, H. (2020). The important roles played in substrate binding of aromatic amino acids in exo-inulinase from *Kluyveromyces cicerisporus* CBS 4857. *Frontiers in molecular biosciences*.
- Macilla-Margalli, N., & Lopez, M. (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from Agave and Dasyliirion species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 7832-7839.
- Makino, Y., Trichel, H., Mazutti, M., Maugeria, A., & Rodriguez, M. (2009). Inulinase bio-production using agroindustrial residues: Screening of microorganisms and process parameters optimization. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 1056-1062.
- Mancilla-Margalli, A., & López, M. G. (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from Agave and Dasyliirion species. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(20), 7832-7839.
- Montañez-Soto J., Venegas-González J., Vivar-Vera M., & Ramos-Ramírez E. (2011). Extracción, caracterización y cuantificación de los fructanos contenidos en la cabeza y en las hojas del agave tequilana weber azul. *Bioagro*, 23(3), 199-206.
- Nagem, R., Rojas, A., Golubev, A., Korneeva, O., Eneyskaya, E., Kulminskaya, A., . . . Polikarpov, I. (2004). Crystal Structure of Exo-inulinase from *Aspergillus awamori*: The Enzyme Fold and Structural Determinants of Substrate Recognition. *Journal of molecular biology*, 471-480.
- Nava-Cruz, N., Medina-Morales, M., Martinez, J., Rodriguez, R., & Aguilar, C. (2014). Agave biotechnology: an overview. *Critical reviews in biotechnology*, 1-14.
- Parsons, J., & Darling, J. (2000). Maguey (*Agave* spp.) utilization in mesoamerican civilization: a case for precolumbian "pastoralism". *Boletin de la sociedad botanica de México*, 81-91.
- Rajput, V., Karthikeyan, M., & Ramasamy, S. (2018). Zebrafish acid ceramidase: Expression in *Pichia pastoris* GS115 and biochemical characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 587-593.
- Roda, S., Santiago, G., & Guallar, V. (2020). Mapping enzyme-substrate interactions: its potential to study the mechanism of enzymes. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 1-31.
- Rodríguez-Sotres, R., & Martínez-Castilla, L. (2010). A Score of the ability of a three-dimensional protein model to retrieve its own sequence as a quantitative measure of its quality and appropriateness. *PLoS One*, 1-19.
- Rouwenhorst, R. J., Visser, L. E., Van der Baan, A. A., Scheffers, W. A., & Van Dijken, J. P. (1988). Production, distribution and kinetic properties of inulinase in continuous culture of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Applied environmental microbiology*, 54, 1131-1137.
- Seok-Hwan, L., Lee, H., Sok, D., & Choi, E. (2010). Recombinant production of an inulinase in a *Saccharomyces cerevisiae* gal80 strain. *Journal of microbiology and biotechnology*, 1529-1533.
- Singh, P. K., & Shukla, P. (2012). Molecular modeling and docking of microbial inulinases towards perceptive enzyme-substrate interactions. *Indian Journal of microbiology*, 373-380.
- Singh, R., Singh, B., & Puri, M. (2007). Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* YS-1. *Bioresource technology*, 2518-2525.

- Trapala, J., Bustos-Jaimes, I., Manzanares, P., Bárzana, E., & Montiel, C. (2020). Purification and characterization of an inulinase produced by a *Kluyveromyces marxianus* strain isolated from blue agave bagasse. *Protein Expression and Purification*.
- Traub, A. (2014). Achicoria: precursor de inulina. *Ministerio de agricultura del gobierno de Chile*, 1-11.
- Treichel, H., Oliveira, D., Lerin, L., Astolfi, V., Mazutti, M., Di Luccio, M., & Oliveira, V. (2011). A review on the production and partial characterization of microbial inulinases. *Global journal of biochemistry*, 3, 1-13.
- Van den Ende, W., Lammens, W., Van Laere, A., Schroeven, L., & Le Roy, K. (2009). Donor and acceptor substrate selectivity among plant glycoside hydrolase family 32 enzyme. *The FEBS journal*, 5788-5798.
- Verhaest, M., Lammens, W., Le Roy, K., De Ranter, C., Van Laere, A., Rabijns, A., & Van der Ende, W. (2007). Insights into the fine architecture of the active site of chicory fructan 1-exohydrolase: 1-kestose as substrate vs sucrose as inhibitor. *New phytologist*, 90-100.
- Vijin, I., & Smeekens, S. (1999). Fructan: more than a reserve carbohydrate? . *Plant Physiology*, 120, 351-359.
- Xia, Y., Chu, W., Qi, Q., & Xun, L. (2015). New insights into the Quickchange process guide the use of phusion dna polymerase for site-directed mutagenesis. *Nucleic acids research* .
- Yu, X.-J., Wang, Z.-P., Liang, M.-j., Wang, Z., Liu, X.-Y., Hu, L., & Xia, J. (2020). One-step utilization of inulin for docosahexaenoic acid (DHA) production by recombinant *Aurantiochytrium* sp. carrying *Kluyveromyces marxianus* inulinase. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 1801-1811.

Anexo

inulinasa

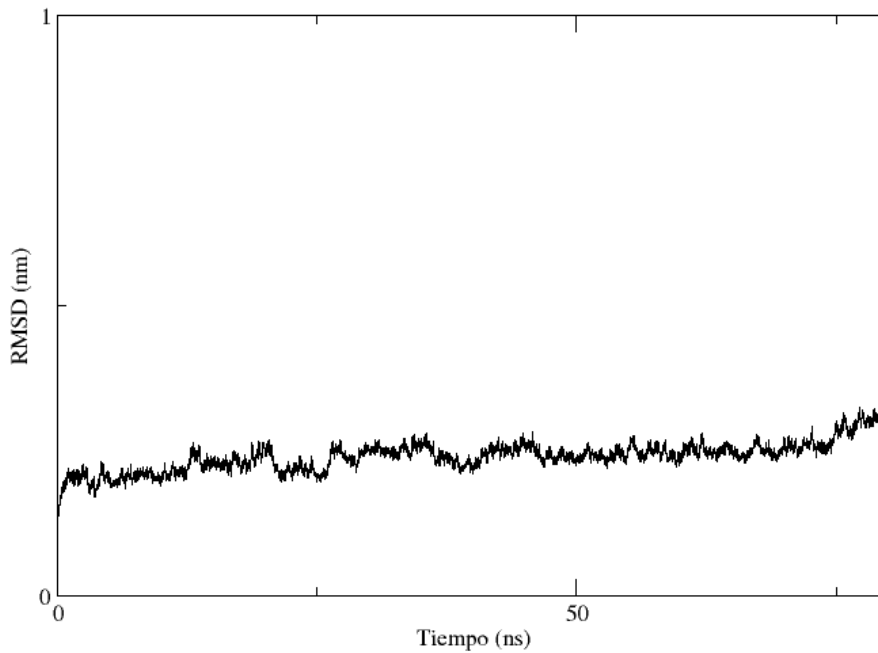


Figura 34. RMSD de la inulinasa de *K. marxianus* en la dinámica molecular de 100 ns del complejo inulinasa-agavina

complejo inulinasa-agavina

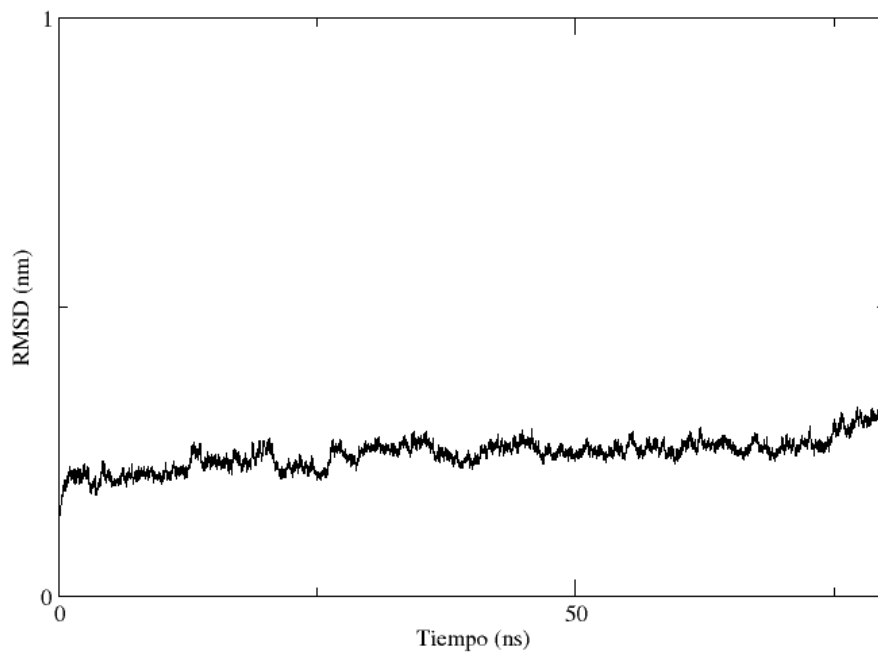


Figura 35. RMSD del complejo de la inulinasa de *K. marxianus* con agavina en la dinámica molecular de 100 ns.

Agavina

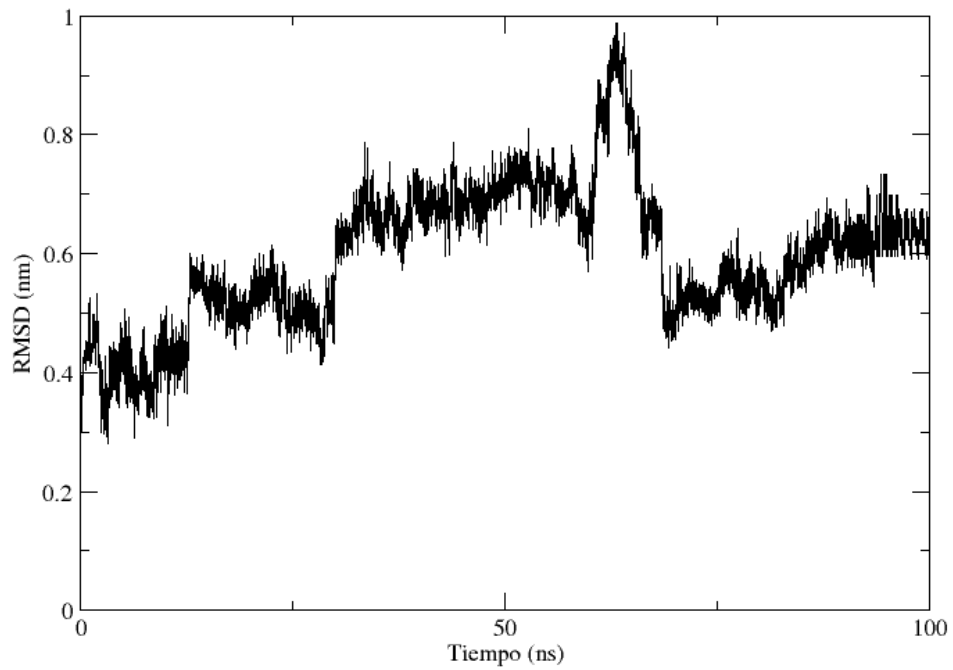


Figura 36. RMSD de la agavina en la dinámica molecular de 100 ns del complejo inulinasa-agavina.

sacarosa

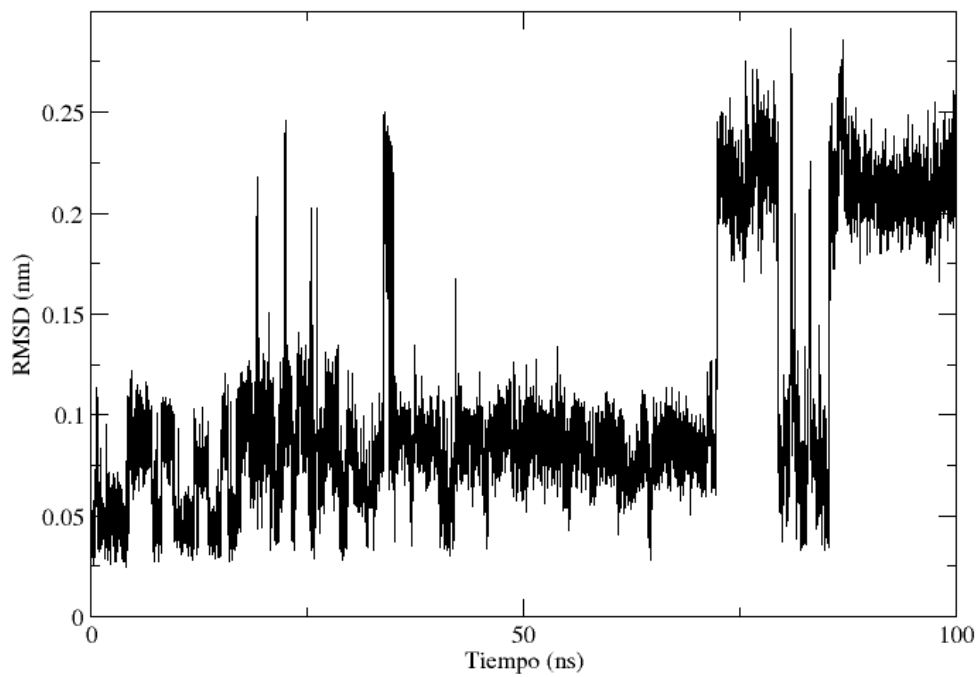


Figura 37. RMSD de la sacarosa en la dinámica molecular de 100 ns del complejo inulinasa-sacarosa.

complejo inulinasa-sacarosa

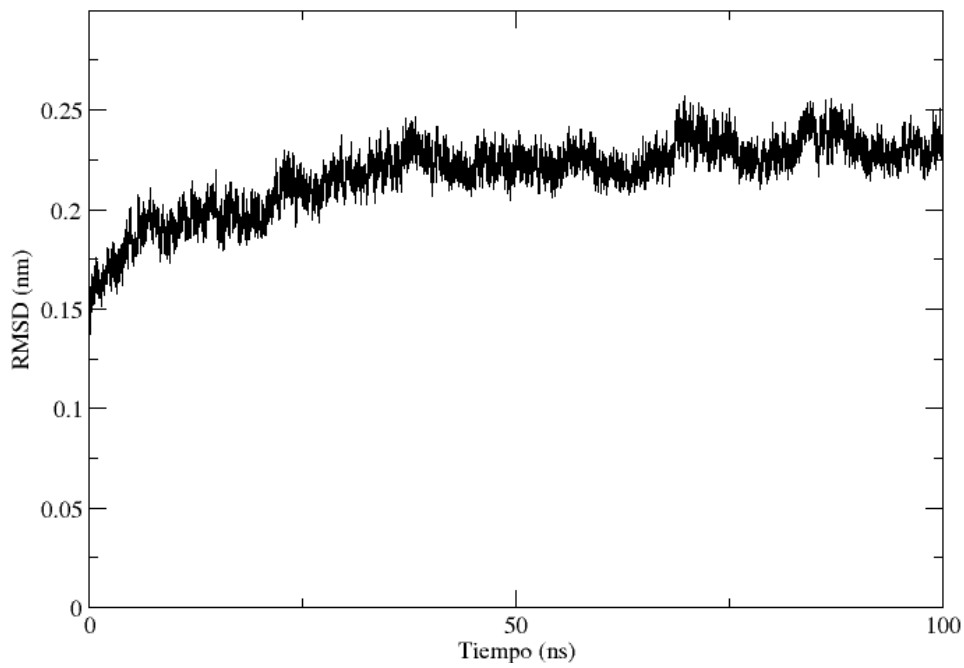


Figura 38. RMSD del complejo de la inulinasa de *K. marxianus* con sacarosa en la dinámica molecular de 100 ns.

Inulinasa

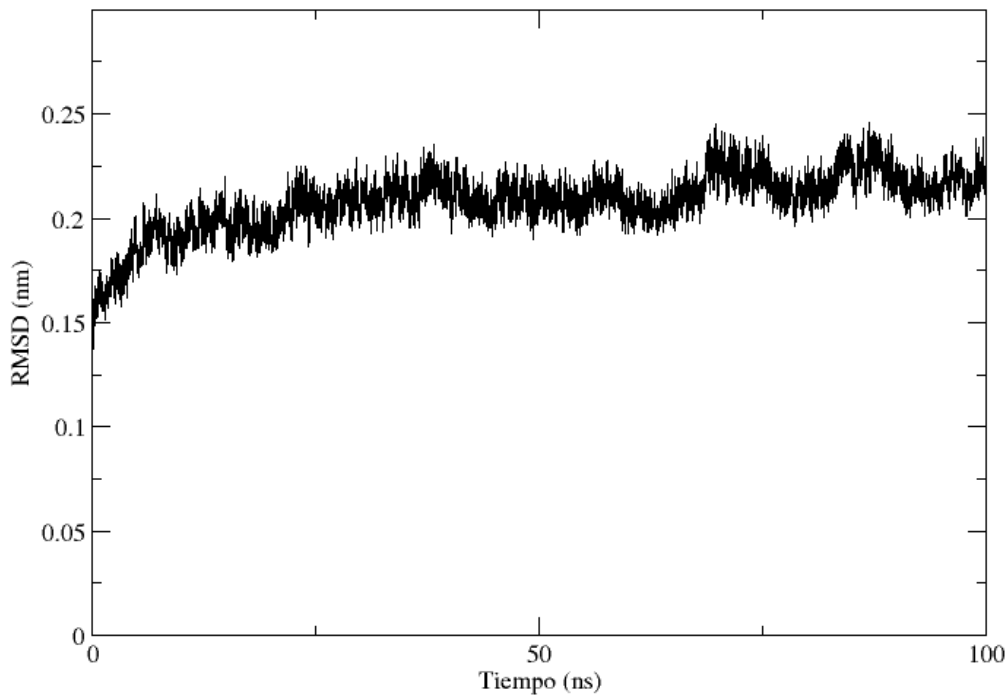


Figura 39. RMSD de la inulinasa de *K. marxianus* en la dinámica molecular de 100 ns del complejo inulinasa-sacarosa

Inulinasa W79A

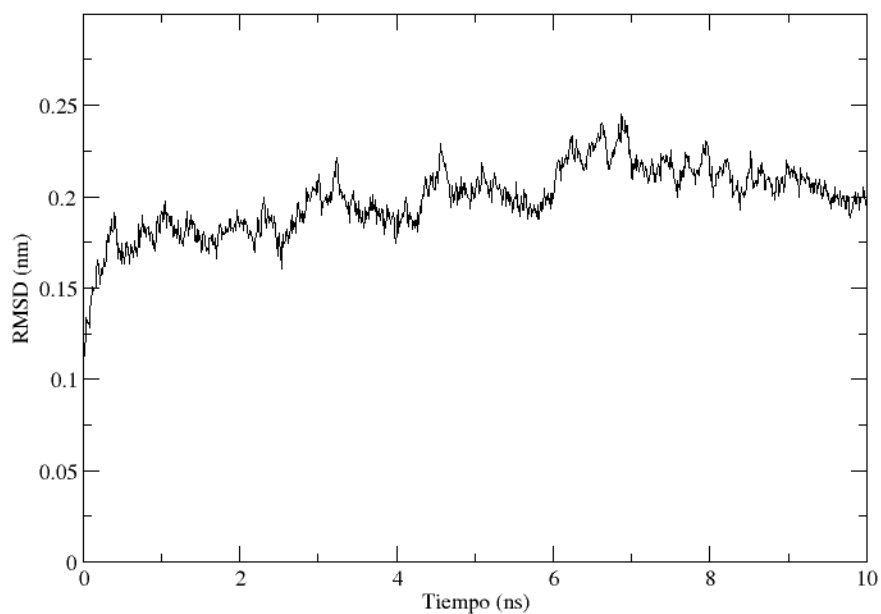


Figura 40. RMSD de la inulinasa con la mutación Trp79Ala de *K. marxianus* en la dinámica molecular de 10 ns del complejo inulinasa-agavina.

Complejo inulinasa W79A-agavina

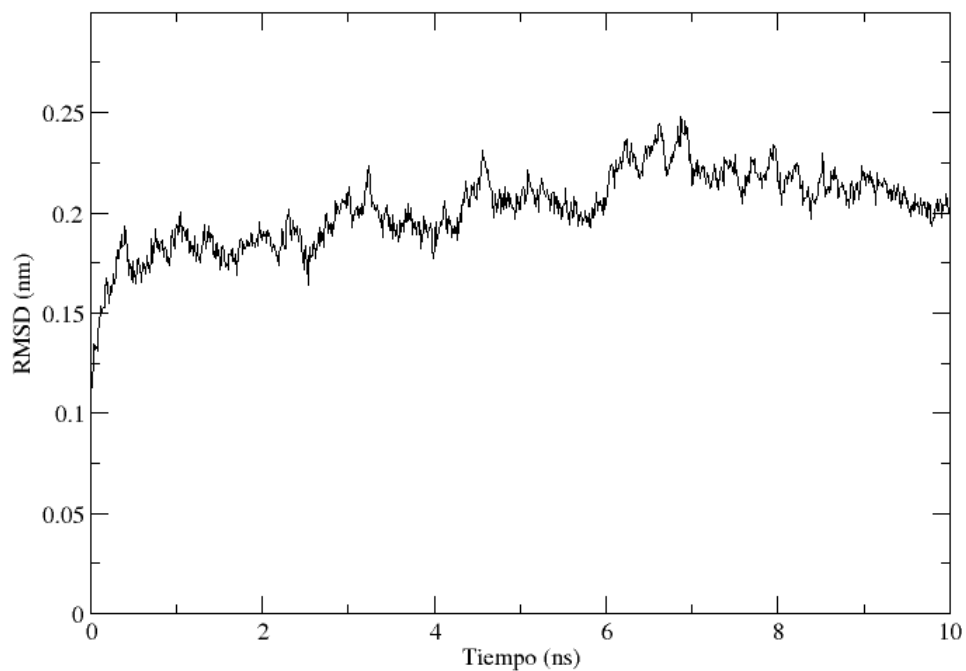


Figura 41. RMSD del complejo de la inulinasa con la mutación Trp79Ala de *K. marxianus* con agavina en la dinámica molecular de 10 ns.

Agavina

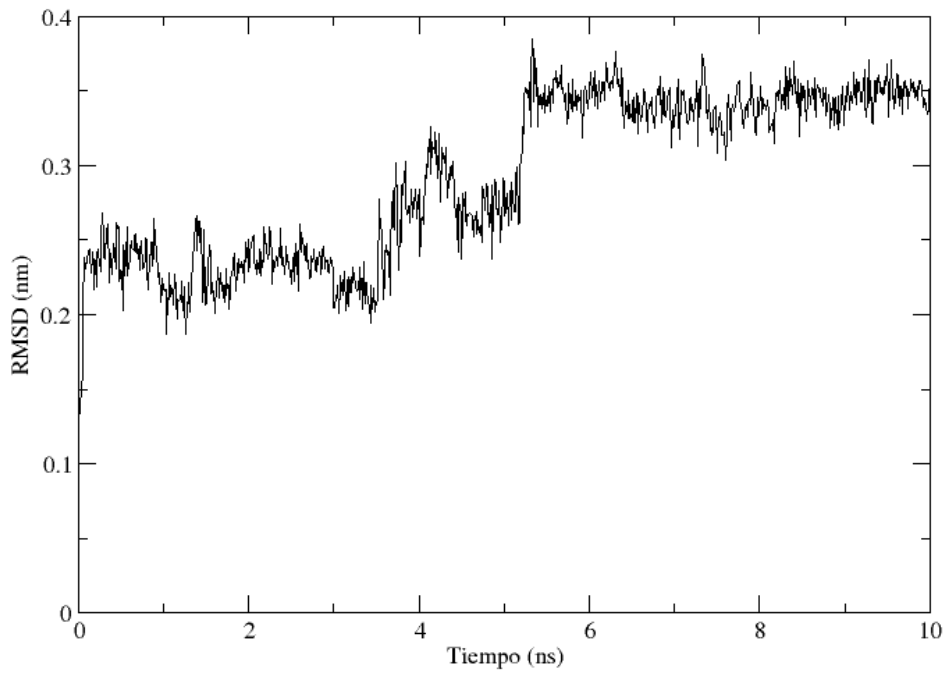


Figura 42. RMSD de la agavina en la dinámica molecular de 10 ns del complejo inulinasa con la mutante Trp79Ala-agavina.

Sacarosa

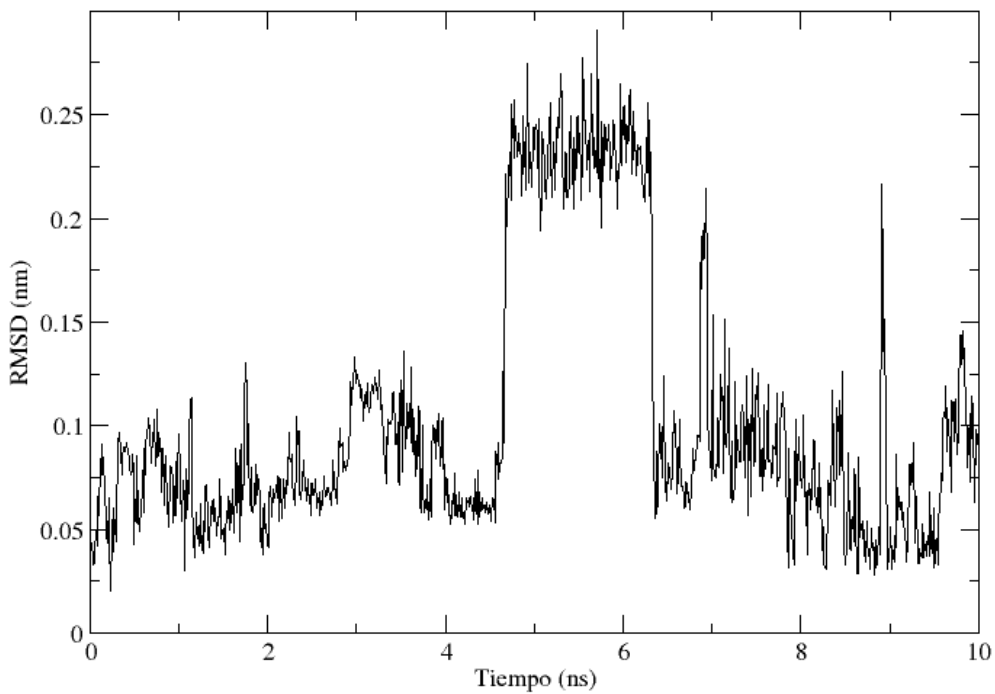


Figura 43. RMSD de la sacarosa en la dinámica molecular de 10 ns del complejo inulinasa con la mutante Trp79Ala-sacarosa.

Inulinasa W79A

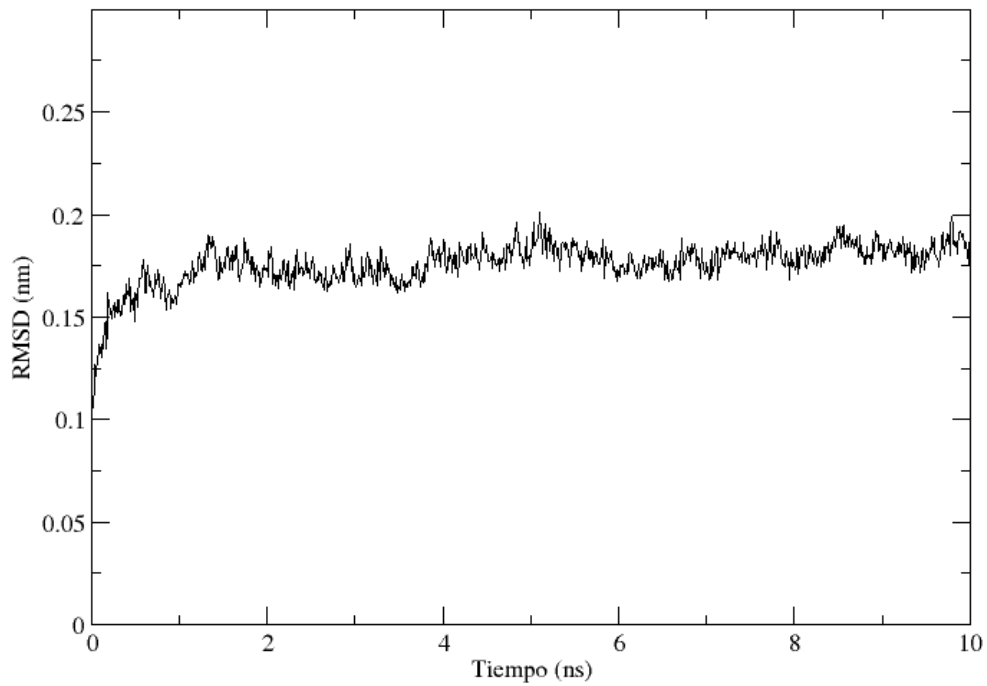


Figura 44. RMSD de la inulinasa con la mutación Trp79Ala de *K. marxianus* en la dinámica molecular de 10 ns del complejo inulinasa-sacarosa.

Complejo inulinasa W79A-sacarosa

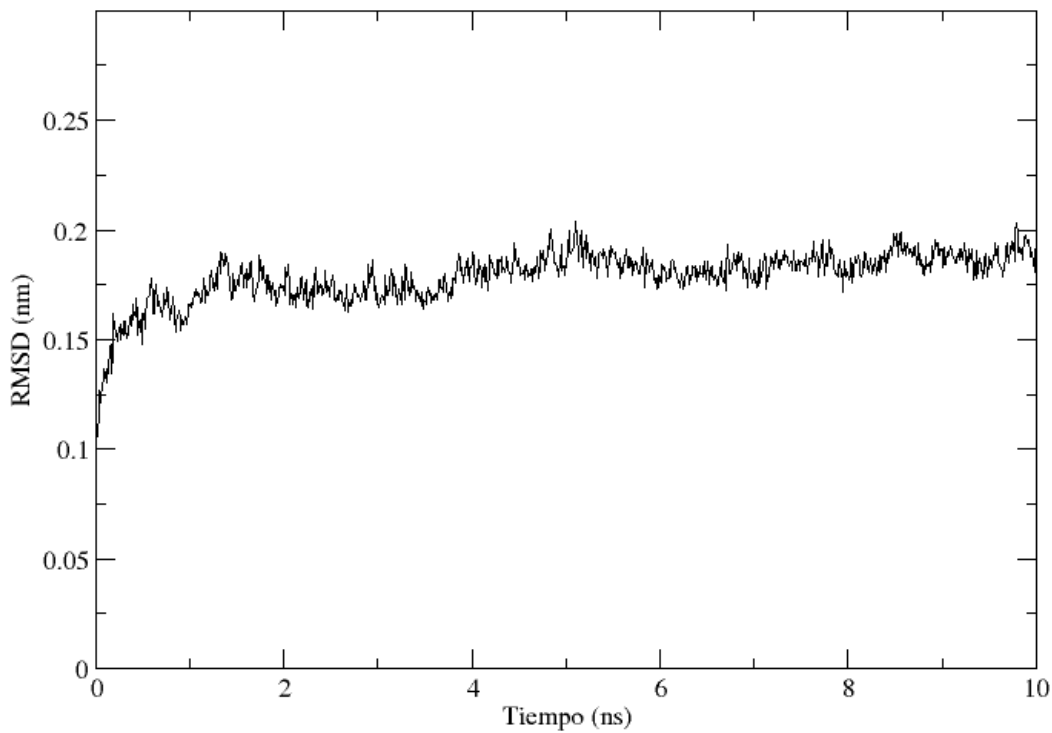


Figura 45. RMSD del complejo de la inulinasa con la mutación Trp79Ala de *K. marxianus* con sacarosa en la dinámica molecular de 10 ns.

Complejo inulinasa W79A-inulina

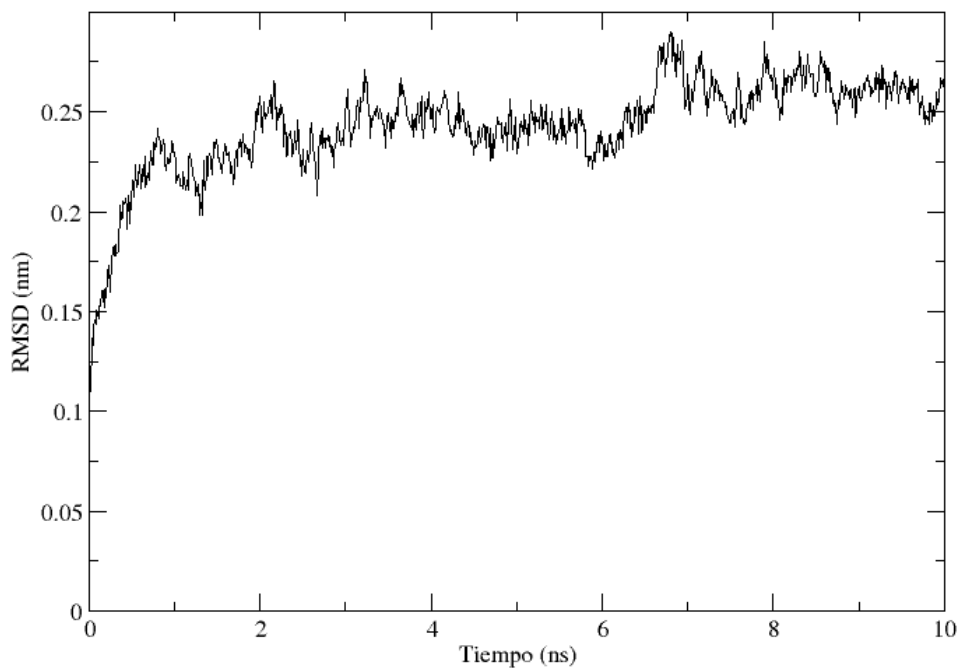


Figura 46. RMSD del complejo de la inulinasa con la mutación Trp79Ala de *K. marxianus* con inulina en la dinámica molecular de 10 ns

Inulinasa W79A

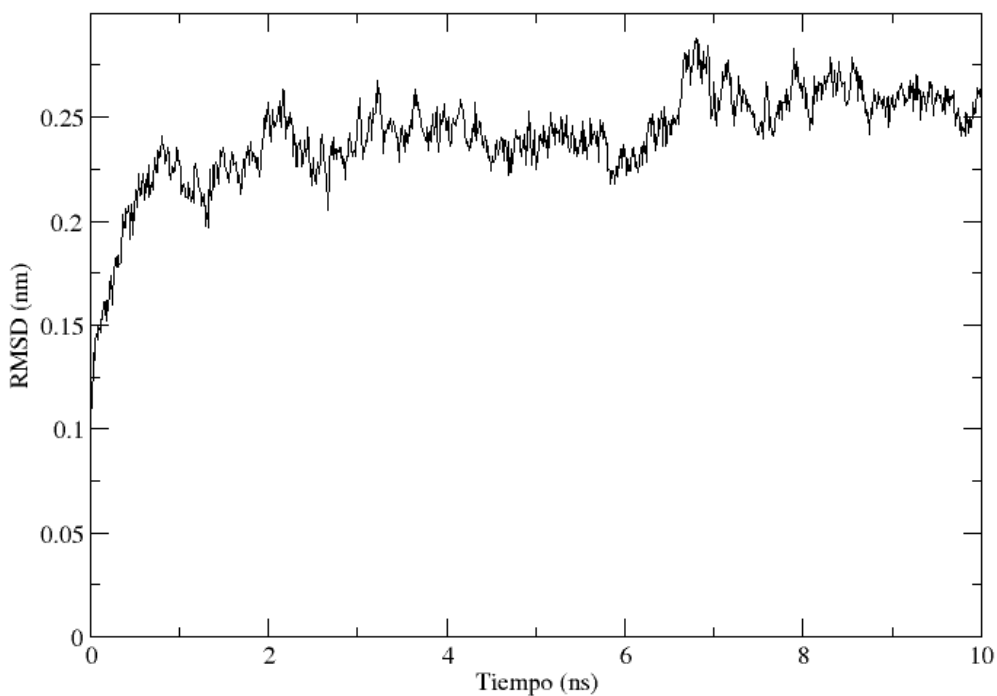


Figura 47. RMSD de la inulinasa con la mutación Trp79Ala de *K. marxianus* en la dinámica molecular de 10 ns del complejo inulinasa-inulina.

Inulina

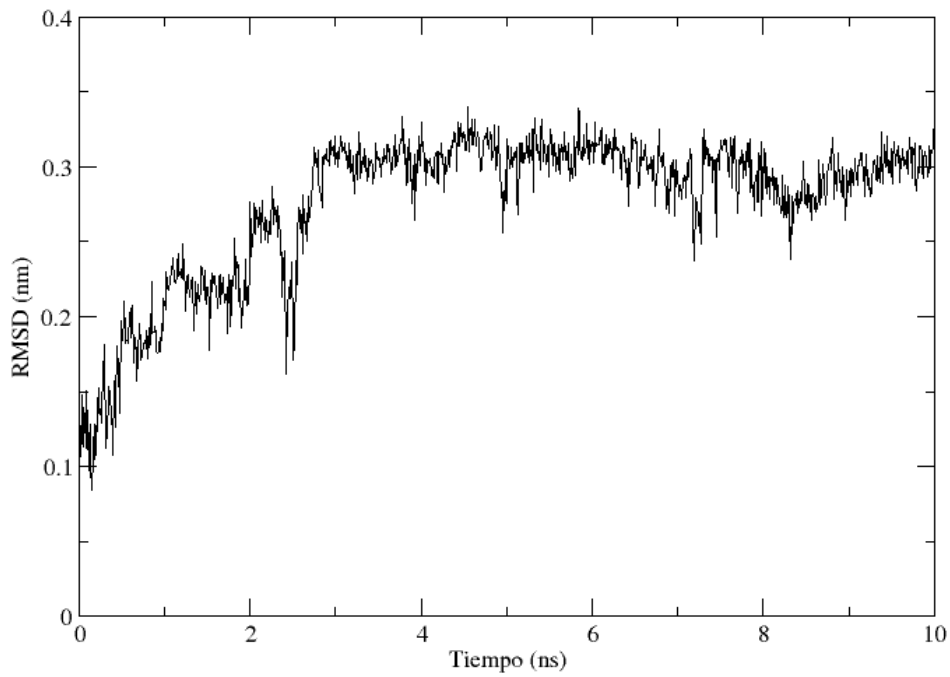


Figura 48. RMSD de la inulina en la dinámica molecular de 10 ns del complejo inulinasa con la mutante Trp79Ala-inulina.

Inulinasa F113A

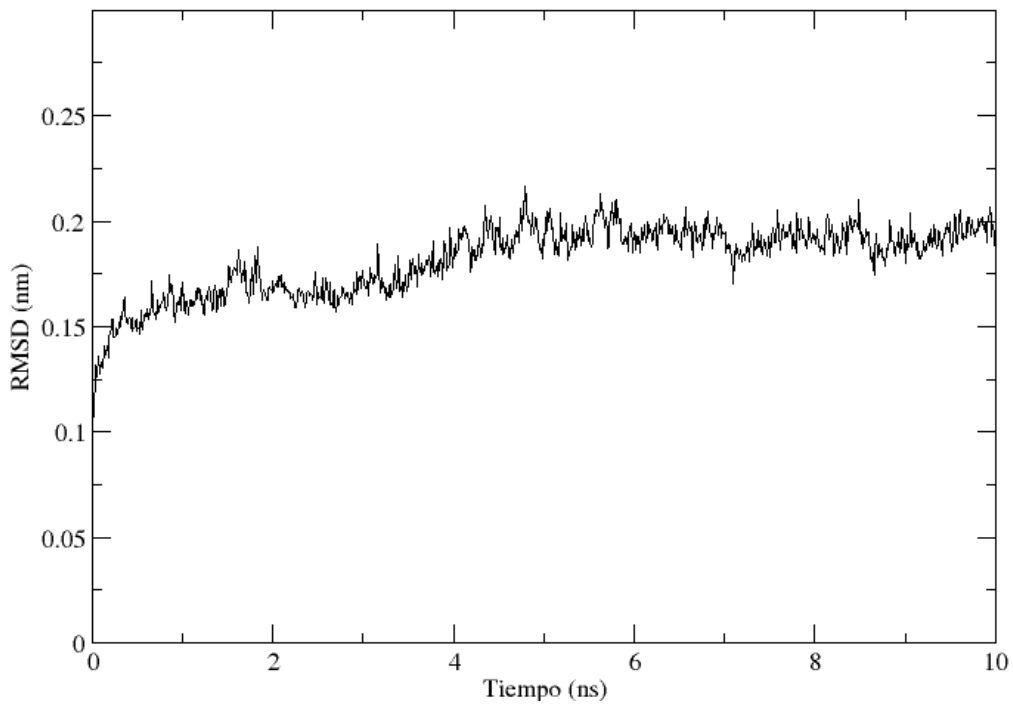


Figura 49. RMSD de la inulinasa con la mutación Phe113Ala de *K. marxianus* en la dinámica molecular de 10 ns del complejo inulinasa-agavina

Agavina

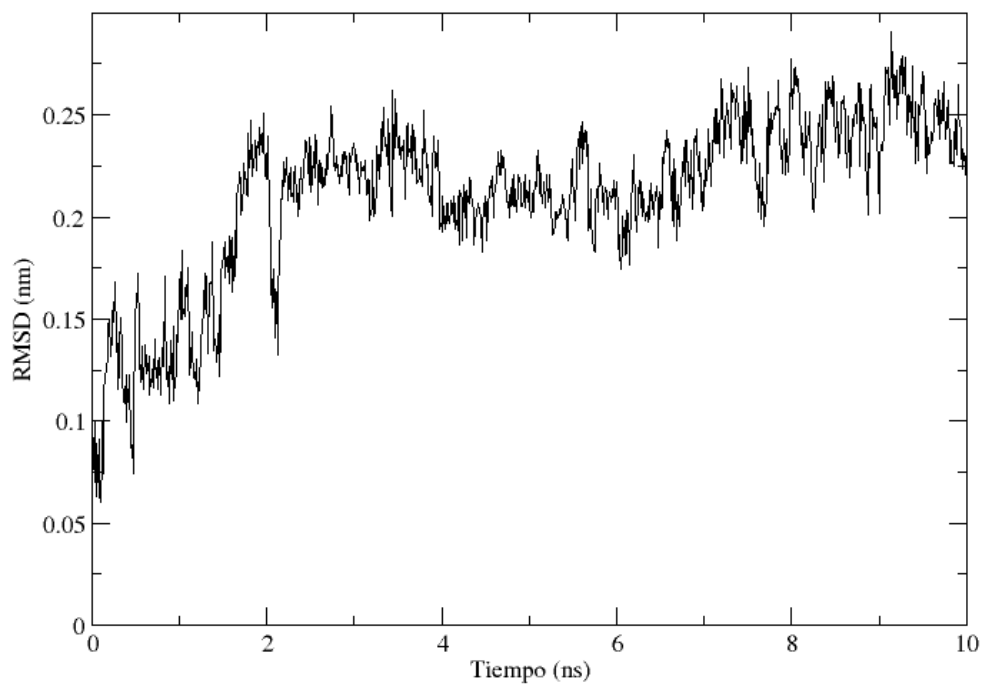


Figura 50. RMSD de la agavina en la dinámica molecular de 10 ns del complejo inulinasa con la mutante Phe113Ala-agavina.

Complejo inulinasa F113A-agavina

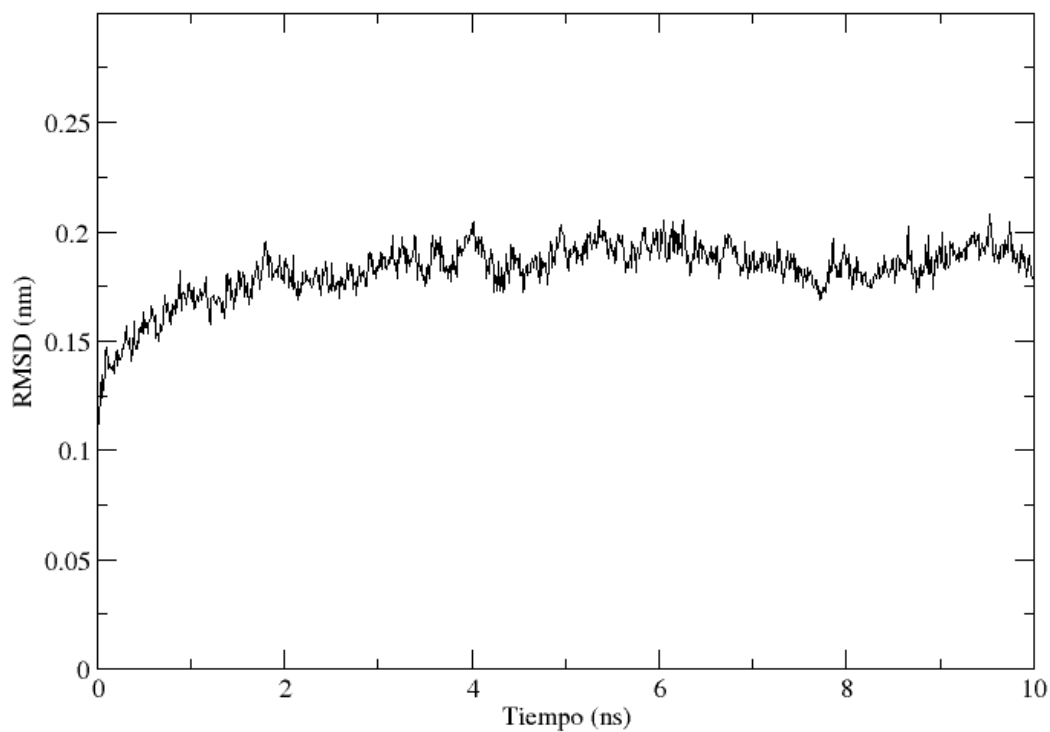


Figura 51. RMSD del complejo de la inulinasa con la mutación Phe113Ala de *K. marxianus* con agavina en la dinámica molecular de 10 ns.

Complejo inulinasa F113A-sacarosa

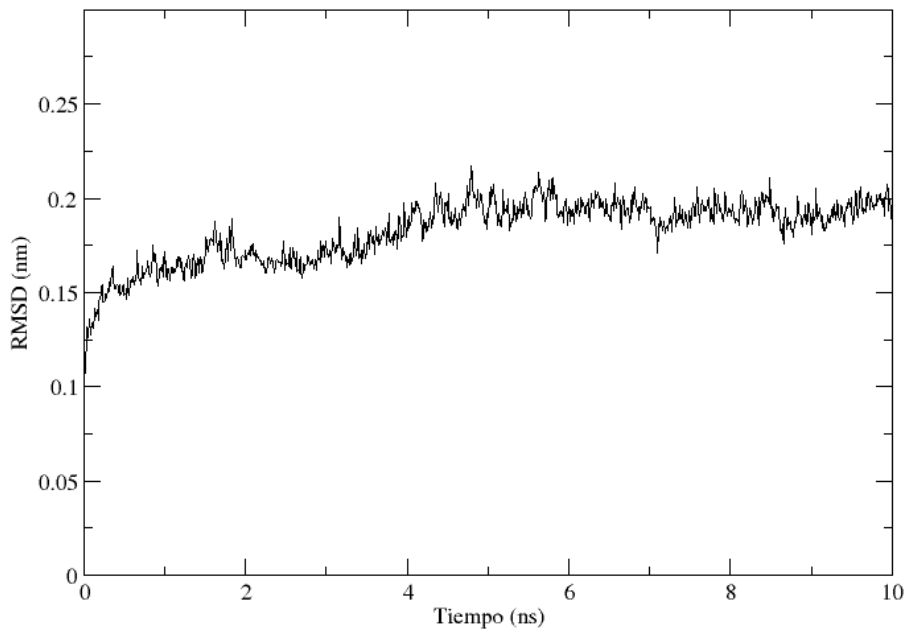


Figura 52. RMSD del complejo de la inulinasa con la mutación Phe113Ala de *K. marxianus* con sacarosa en la dinámica molecular de 10 ns.

Inulinasa F113A

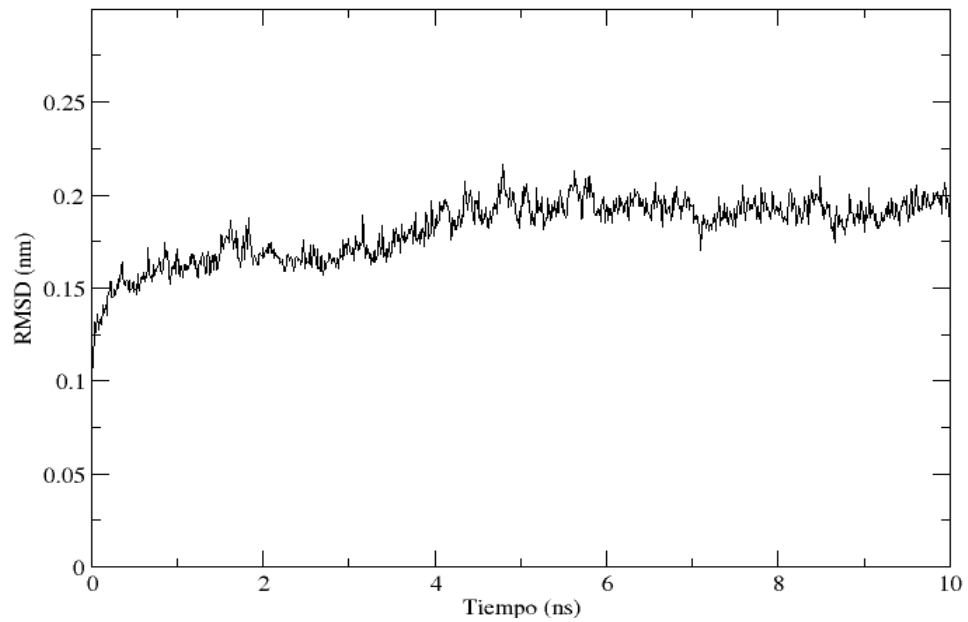


Figura 53. RMSD de la inulinasa con la mutación Phe113Ala de *K. marxianus* en la dinámica molecular de 10 ns del complejo inulinasa-sacarosa

sacarosa

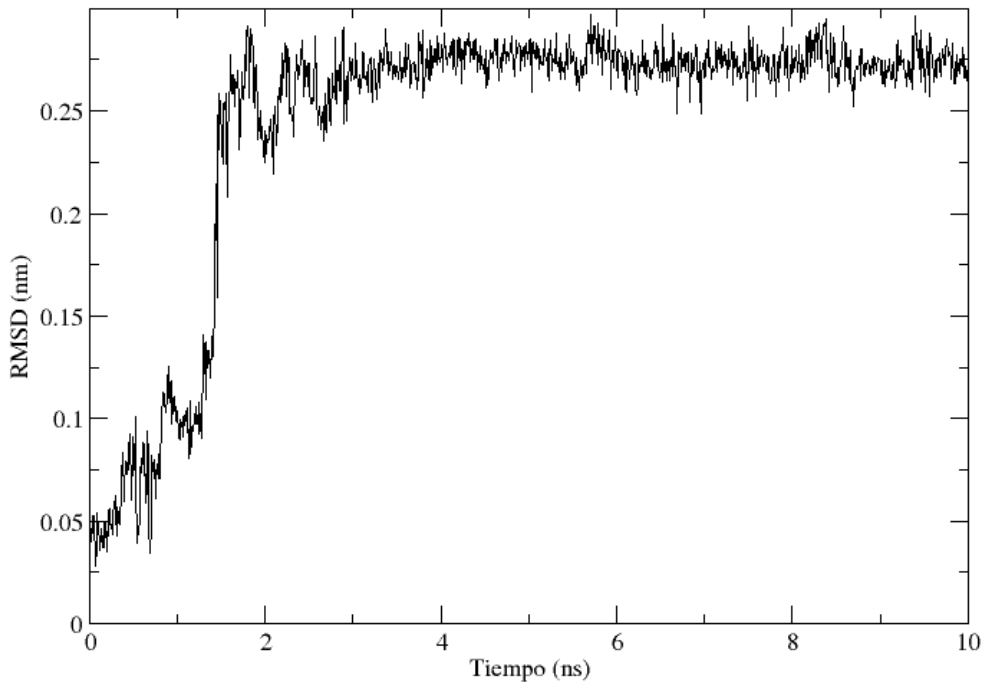


Figura 54. RMSD de la sacarosa en la dinámica molecular de 10 ns del complejo inulinasa con la mutante Phe113Ala-sacarosa.

sacarosa

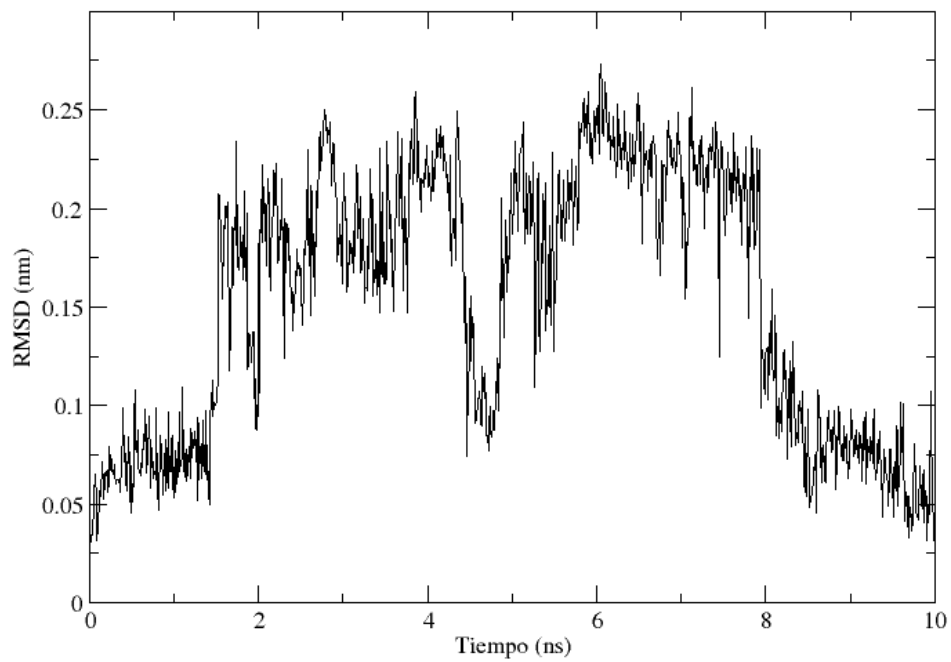


Figura 55. RMSD de la sacarosa en la dinámica molecular de 10 ns del complejo inulinasa con la mutante Gln236Ala-sacarosa.

Inulinasa Q236A

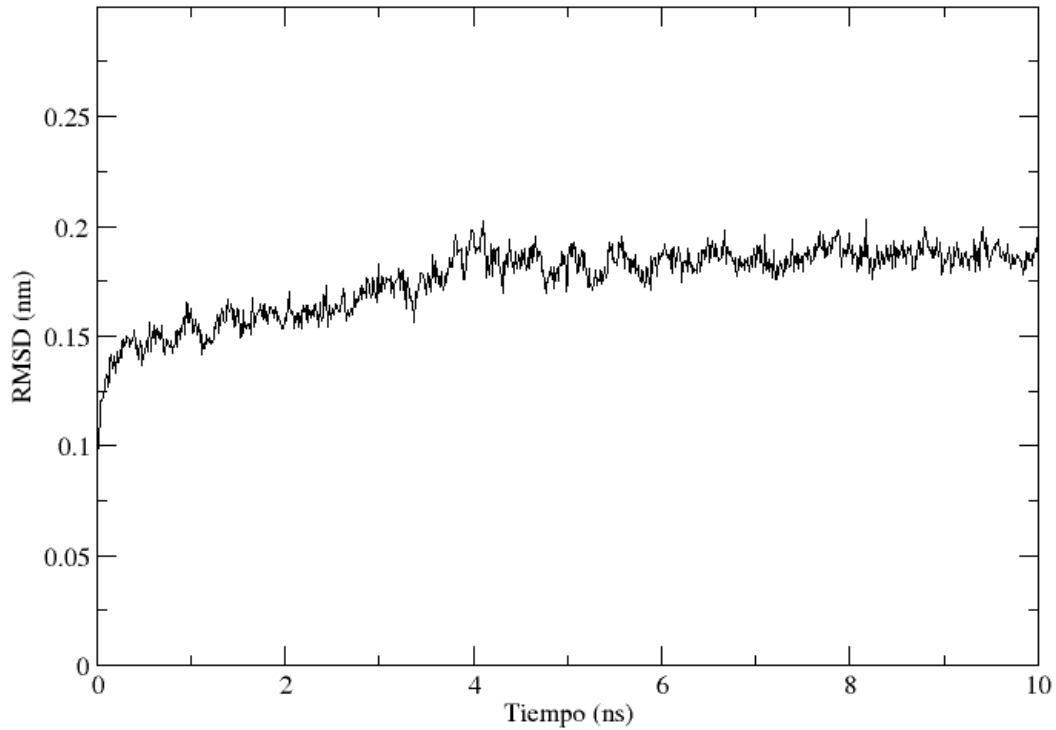


Figura 56. RMSD de la inulinasa con la mutación Gln236Ala de *K. marxianus* en la dinámica molecular de 10 ns del complejo inulinasa-sacarosa.

Complejo inulinasa Q236A-sacarosa

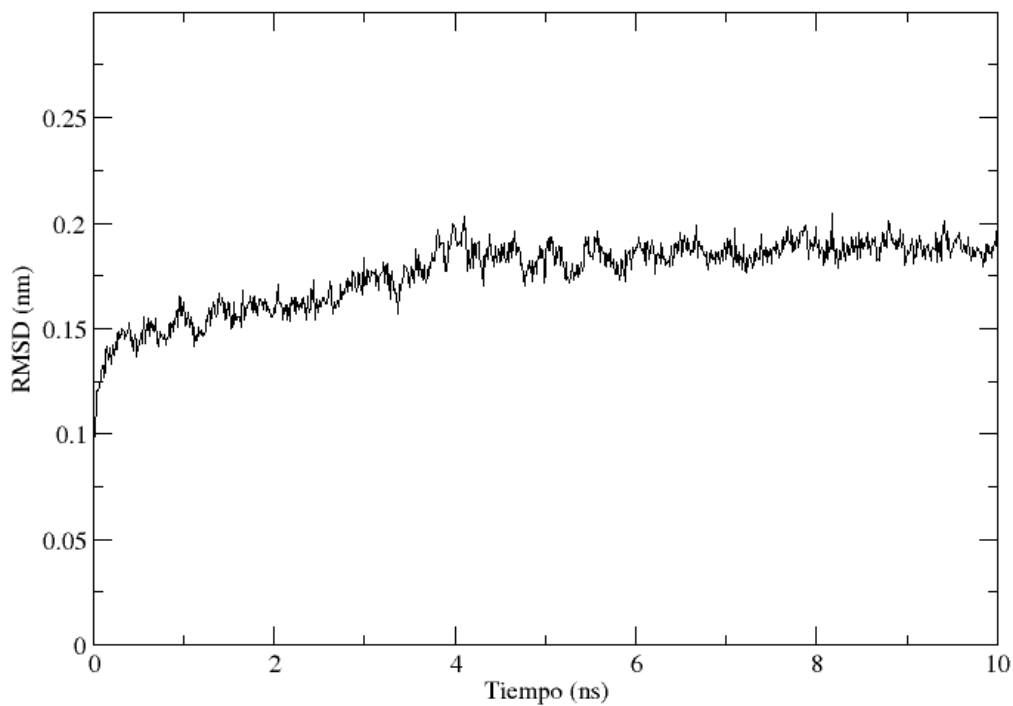


Figura 57. RMSD del complejo de la inulinasa con la mutación Gln236Ala de *K. marxianus* con sacarosa en la dinámica molecular de 10 ns.

Complejo inulinasa Q236A-agavina

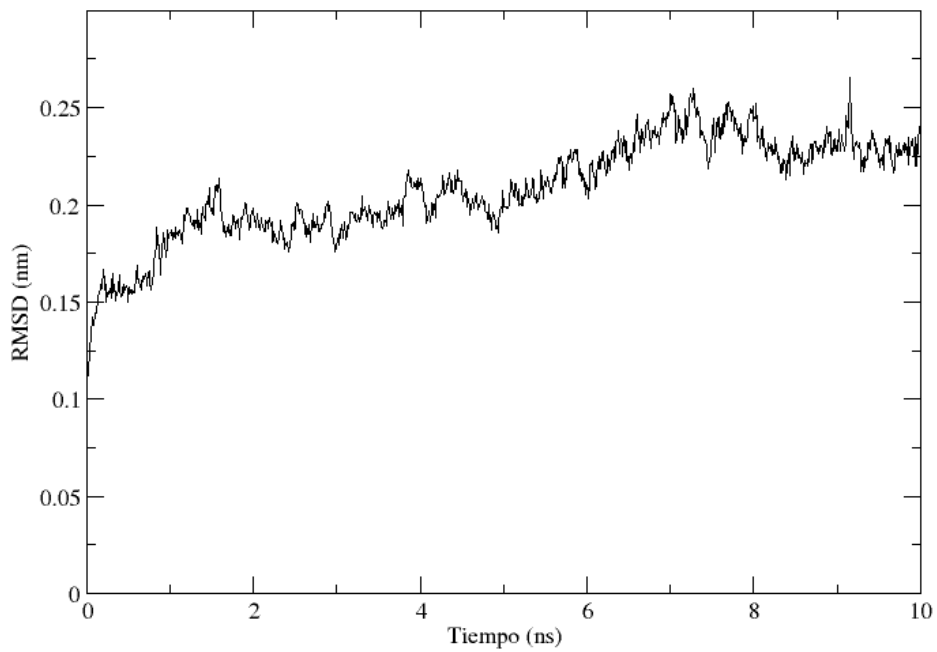


Figura 58. RMSD del complejo de la inulinasa con la mutación Gln236Ala de *K. marxianus* con agavina en la dinámica molecular de 10 ns

Agavina

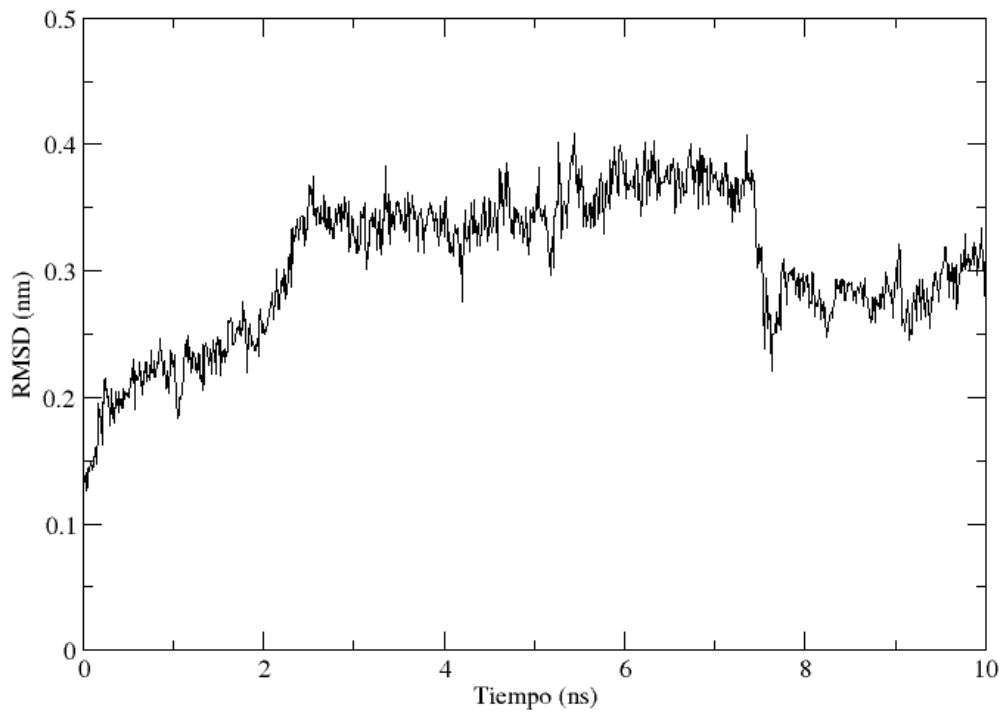
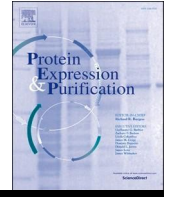


Figura 59. RMSD de la agavina en la dinámica molecular de 10 ns del complejo inulinasa con la mutante Gln236Ala-agavina.

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Protein Expression and Purification



Purification and characterization of an inulinase produced by a *Kluyveromyces marxianus* strain isolated from blue agave bagasse

Jonathan Trapala ^a, [Ismael Bustos-Jaimes](#) ^b, [Paloma Manzanares](#) ^c, [Eduardo Ba'rzana](#) ^a,
Carmina Montiel ^{a,*}

^a Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City 04510, Mexico

^b Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, Mexico City 04510, Mexico

^c Centro de Investigaciones Energéticas, Medio Ambientales y Tecnológicas (CIEMAT), Madrid 28040, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Inulinase

Kluyveromyces marxianus Branched inulin Enzymatic hydrolysis

ABSTRACT

Exo-inulinases are versatile enzymes that have gained attention in recent years due to their ability to hydrolyze linear and branched polyfructose chains found in inulins. Agavin, a branched inulin, is found in Agave plant, the raw matter to produce tequila. Our group has isolated several microbial strains from agave bagasse, an agro-industrial residue from tequila production that increases yearly. Strain IS03, identified as *Kluyveromyces marxianus*, showed a remarkable activity towards agavin, and from its fermentation liquor an inulinolytic enzyme (Inu-IS03) was purified. The isolated enzyme is a glycosylated dimeric protein with a molecular mass of ~256 kDa, as determined by DLS and SEC. The enzyme has an isoelectric pH of 4.6 and has both inulinase and invertase activities with an I/S ratio (ratio of activity with agavin to activity with sucrose) of 1.39. The enzyme has temperature and pH optima of 50 °C and 5.5, respectively, and follows hyperbolic kinetics with agavin (k_{cat} of $339 \pm 27 \text{ s}^{-1}$ and K_M of $11.8 \pm 1.5 \text{ mM}$). The remarkable activity of Inu-IS03 on linear and branched inulin spotlights this enzyme as a potential player in the treatment of agricultural residua for the generation of added-value products.

1. Introduction

Exo-inulinases (β -D-fructan fructohydrolase, EC 3.2.1.80) hydrolyze terminal fructosyl residues from the non-reducing end of fructans. Exo-inulinases belong to glycoside hydrolase family 32, with a consensus pattern H-X (2)-[PV]-X (4)-[LIVMA]-N-D-P-N-[GA], where the acceptable amino acids for a given position are between square parentheses (<http://prosite.expasy.org/PS00609>). Recently, the three-dimensional structure of the exo-inulinase from *K. marxianus* was reported in PDB (6J0T) with a resolution of 2.8 Å. The crystals belong to space group I 4₁ 2₂, with a homodimeric biological unit in a butterfly arrangement. Chains A and B consist of 507 and 512 residues of the total 556 residues, for a total molecular mass of 124.6 kDa as calculated from its primary structure. The N terminal domain has the 5-bladed beta-propeller fold in which the catalytic site is formed, while the C-terminal domain is arranged as a six-stranded antiparallel beta-sandwich. This general fold is conserved in the exo-inulinase from *Aspergillus awamori* [1,2], as expected for homologous proteins [3–6].

Fructans are fructose polymers present in plants, synthesized from sucrose in vacuoles [7], mainly from the genus *Asteraceae* (dicots), *Liliaceae* and *Poaceae* (monocots), as carbohydrate reserve. Fructans produced by plants such as chicory or dandelion, named inulin, have β -(2 → 1) bonds between β -D-Fructose moieties, while those produced by microorganisms, called levans, have β -(2 → 6) linkages [8]. However, agave plants contain a complex fructan of the neo-inulin type (α -D-Glucose moiety inside the chain), named agavin, that has β -(2 → 1) and β -(2 → 6) linkages between β -D-Fructose moieties [9]. Agavin presents a molecular weight distribution of 500–5000 Da, with a degree of polymerization (DP) from 3 to 29 [10,11].

Exo-inulinases hydrolyze inulins in a single-step to produce fructose with yields close to 90–95% under improved conditions [12]. Currently, the production of fructose is an important goal in the biotechnological industries because it is sweeter than sucrose and has wide applications in foods, beverages, and pharmaceuticals. It is produced from starch by an enzymatic process involving 2 enzymes, resulting in a mixture of products (oligosaccharides 8%, fructose 42%, and glucose 50%).

* Corresponding author.

E-mail address: carmina@unam.mx (C. Montiel).

<https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105718>

Received 10 April 2020; Received in revised form 25 July 2020; Accepted 25 July 2020

Available online 7 August 2020

1046-5928/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved. Fructose can also be produced by chemical hydrolysis of sucrose; however, inulinase activity determination was carried out using the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method for reducing sugars [17]. One inulinase, however, this process generates undesirable by-products like hydroxymethylfurfural. Thus, fructose production from inulin catalyzed by inulinases represents an innovative approach as it consists of a single-step reaction [13,14].

In this work, the purification and biochemical characterization of an extracellular exo-inulinase is reported. The enzyme is produced by a strain of *K. marxianus* isolated from blue agave bagasse, able to grow in agavin as the sole carbon source. This yeast is an endophytic microorganism, that belongs to the functional microbiota of agave [15]. Therefore, it was hypothesized that this microorganism can efficiently degrade agavin and will be an excellent source of inulinase for the industrial use of agave bagasse for β -D-Fructose production.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Agavin from *Agave tequilana* Weber var. Azul was kindly provided by Nekutli S.A, Jalisco, Mexico. Inulin from chicory and linear fructooligosaccharides (FOS) from chicory inulin (Orafti P95) were purchased from BENE-Orafti (Belgium). The average molecular weight of agavin (3874 Da) and inulin (5000 Da) were determined by size exclusion chromatography (SEC). All the other chemicals were reagent grade.

2.2. Strain isolation and identification

Strain ISO3 was isolated from residues of blue agave bagasse provided by Patron, a distillery located in Guadalajara, Mexico. One gram of bagasse was mixed with 5 mL of NaCl solution (0.9% m/v) and stirred overnight, then 1 mL of dilutions 1:10, 1:100 and 1:1000 were cultured in solid medium with agavin 0.5% (w/v) as the sole carbon source, 0.2%

(w/v) yeast extract, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 0.1% (w/v), KCl 0.05% (w/v), MgSO_4 0.05% (w/v), and bacteriological agar 1.5% (w/v) at 30 °C for 24 h. Isolated strains were grown in the same liquid medium and screened for inulinase activity by the DNS method, as described in section 2.4. This strain was identified by sequencing the ITS1 and ITS2 regions as described by Schoch et al. [16]. ITS regions were amplified with primers ITS1 (F) 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' and ITS4 (R) 5'-TCCTCCGTTATTGATATGC-3'.

The conditions for the PCR amplification were initial denaturation at 94 °C for 3 min, followed by 34 cycles consisting of denaturation at 94 °C for 40 s, annealing at 56 °C for 40 s, extension at 70 °C for 40 s and a final extension step at 72 °C for 7 min.

PCR was using a Verity Thermal Cycler. PCR product was purified and sequenced by Laragen, Inc. (USA). Identification was carried out by sequence alignment to GenBank.

2.3. Culture conditions

To identify the best substrate to produce inulinolytic activity, glucose, fructose, agavin, and inulin from chicory were assayed. Culture medium consisted of (% w/v): substrate 0.5, yeast extract 0.2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1, KCl 0.05, and KH_2PO_4 0.1, pH 5.0. Then, 100 μL of medium was inoculated with 5 mL of a 15 h-old culture of *K. marxianus* ISO3 and incubated under orbital shaking (150 rpm) at 30 °C. In each experiment, 1 mL of sample was taken at different times to determine biomass production, protein concentration, and enzymatic activity.

2.4. Enzymatic assay

The fermented medium was centrifuged at 10,000 rpm for 15 min at 4 °C. Then 200 μL of cell-free supernatant were mixed with 0.8 mL of sodium acetate buffer (50 mM, pH 5.5) with a final concentration of 1% agavin. The reaction mixture was incubated at 50 °C in an Eppendorf Thermomixer for 30 min and shaking of 500 rpm. The reaction was stopped by a sudden temperature change to 100 °C for 3 min. The (IU) was defined as the amount of enzyme that produces one μmol of fructose per minute.

2.5. Thin layer chromatography

The products of the reaction were detected by TLC using silica gel on thin aluminum layers (5 \times 10 cm). Aliquots of 3 μL were spotted on the TLC plate and then eluted with a mix of butanol:methanol:water (3:2:1). Sugars were visualized by the orcinol-sulfuric acid reagent (5% sulfuric acid in methanol and 10 mg/mL orcinol) and heating at 100 °C for 10 min. Fructose, agavin, sucrose, and linear FOS, with a DP from 2 to 7, were used as standards.

2.6. Enzyme purification

Strain ISO3 was cultured in 1 L of media previously described added with 0.5% agavin as the sole carbon source, pH 5, for 64 h at 30 °C, 150 rpm. Cells were harvested by centrifugation at 10,000 rpm for 15 min at 4 °C. The supernatant was concentrated using ultrafiltration spin column (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit, molecular mass cut-off 30 kDa, Sigma-Aldrich). Then the concentrated enzyme was further purified by anionic exchange chromatography in DEAE Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, USA) followed by size-exclusion chromatography in

Sephadex G-200 (1 40 GE Healthcare, USA), in an FPLC A[™]kta purifier.

Filtered sample (1 mL) was loaded in a 1 mL Hitrap DEAE FF (GE Healthcare Life Sciences, USA) equilibrated with equilibrium buffer (H_2NaPO_4 50 mM, pH 7.2), at a flow rate of 1 mL/min and eluted with 20 column volumes in a one-step gradient of 7% of NaCl 2 M. 5 fractions of 1 mL were collected and assayed for protein concentration and inulinase activity as described above.

Before applying the step gradient elution, a NaCl linear gradient from 0 to 2 M prepared in the same buffer was used at a flow rate of 1 mL/min. The concentration of NaCl at which the enzymatic activity was detected served to establish the single-step NaCl concentration for elution.

Fractions with inulinase activity were pooled together, concentrated, and loaded in the Superdex 200 column (1 40 GE Healthcare Life Sciences, USA) previously equilibrated with equilibrium buffer added with 0.5 M NaCl. Elution was carried out at a flow rate of 0.5 mL/min. Fractions with activity were pooled again and the purity of the enzyme was evaluated by SDS-PAGE. The protein concentration was determined by the Bradford method against a standard calibration curve for bovine serum albumin (BSA). The same purification process was used for the inulinases from *K. marxianus* strains NRRL-Y-1109 and DER, and the exo-inulinase protein from the commercial preparation Novo 960, that were used for comparative analysis.

2.7. Protein characterization

2.7.1. Electrophoretic analysis of protein

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed using 10% polyacrylamide according to the method of Laemmli [18]. Samples were treated with sample buffer and boiled for 5 min before loading the gel. Electrophoresis was run on a Mini Protean tetra system (Bio-Rad, USA) at a constant voltage (100 V). The gel was stained with Coomassie Blue R-250. Molecular weight standards (Precision Plus Protein Dual Xtra, Bio-Rad, USA) were included to determine the molecular weight of the denatured protein.

2.7.2. Size-exclusion chromatography (SEC)

The molecular weight of the purified enzyme in its native form was estimated by SEC in a Sephadex G-200 column (1 40 GE Healthcare, USA). The column was calibrated with a kit of gel filtration standards (Bio-Rad, USA) that contains a lyophilized mixture of molecular weight markers ranging from 1.35 to 670 kDa. The distribution coefficient, K_d , was determined for each marker and related to the molecular weight to obtain a standard curve and calculate the molecular weight of the enzyme.

2.7.3. Dynamic light scattering (DLS)

The molecular weight of the purified enzyme in its native form was also estimated by DLS in a Zetasizer μV (Malvern) equipped with a photodiode laser (830 nm). The purified enzyme solution was filtered and 500 μL (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were placed into the equipment cuvette and equilibrated at 25 $^\circ\text{C}$ for 10 min. Ten measurements were collected during 30 s for each sample. The data were analyzed to obtain the hydrodynamic radius (R_H) value. The reported R_H value is the mean size of the dominant peak which is correlated with the molecular weight.

2.7.4. Isoelectric focusing (IEF)

Isoelectric focusing was performed, using 15 μg of the protein in 125 μL of buffer containing 0.2% CHAPS, 7 M thiourea, and 0.05% (m/v) ampholine. The sample was loaded in an IEF strip pH range (3.0–10). After the strip was hydrated by 12 h with mineral oil and the IEF was carried out for 1 h at a constant voltage of 100 V in a Protean i12 IEF system. The strip was washed with 2 mL of SDS solution (1% m/v) and placed in a polyacrylamide gel (10%) with a molecular weight marker. Afterward, the electrophoresis was implemented during 1.5 at 100 V, and Coomassie blue staining was performed. All steps were carried out with Biorad reagents and according to its instruction manual (catalog #164–6000). The isoelectric point of the enzyme was determined using the plot of relative mobility.

2.7.5. Glycosylation and deglycosylation

The method of Schiff was used to determine whether the enzyme was glycosylated. An electrophoresis SDS-PAGE was performed with 25 μL of protein (1.8 mg/mL) at 100 V. After washing the gel, a solution of HIO_4 1% (v/v) was added to generate aldehyde groups in the carbohydrates. Then the gel was washed twice with milli Q water and placed in Schiff's solution until magenta bands were visible. Finally, a solution of meta-sulfite 0.5% was added after 2 h and the gel was washed again. To estimate the molecular mass of the deglycosylated protein, the enzyme was deglycosylated using a mixture of enzymes from the Enzymatic Protein Deglycosylation Kit (EDEGLY) (Sigma-Aldrich) that contains Peptide:N-glycosidase F (PNGase F), Endo-O-Glycosidase, α -2 (3,6,8,9)-Neuraminidase, β -(1 \rightarrow 4)-D-galactosidase, and β -N-acetylglucosaminidase. For the deglycosylation reaction, 0.1 mg of pure lyophilized protein was resuspended in 30 μL of MilliQ water; 10 μL of 5X reaction buffer and 2.5 μL of denaturing buffer were added and the mixture was heated to 90 $^\circ\text{C}$ for 10 min to complete protein denaturation. Afterward, the mixture was cooled to room temperature and 5 μL of Triton X100 and 1 μL of each enzyme in the kit were added, gently mixed, and incubated for 3 h at 37 $^\circ\text{C}$. The reaction was analyzed by SDS-PAGE stained by the periodic acid/Schiff method.

2.7.6. Temperature and pH effects on enzyme activity

To determine the best conditions of reaction, the effect of temperature on enzyme activity of the purified inulinase was determined at pH 5.5 with 1% agavin as substrate and temperatures within the range of 30–70 $^\circ\text{C}$. The reaction was stopped at 100 $^\circ\text{C}$ by 10 min. Thermal stability was determined by pre-incubating the enzyme at a fixed temperature for different times and measuring its residual activity at 50 $^\circ\text{C}$. The activity was expressed relative to the initial activity of the enzyme. The origin of activity loss was investigated by changes in its hydrodynamic radius. The enzyme was pre-incubated (500 μL of enzyme, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in 50 mM phosphate buffer (pH 7.2) at temperatures ranging from 25 to 70 $^\circ\text{C}$ for 10 min in a Zetasizer μV (Malvern) equipment. DLS values for each sample were averaged over 10 runs, of 10 measurements of 30 s per run at each temperature. The optimum pH of the purified inulinase was determined by assaying the enzyme activity at 50 $^\circ\text{C}$ in a pH range of

3.5–7.5. Sodium acetate buffer (50 mM) was used in the pH range of 3.5–5.5, whereas sodium phosphate buffer was used for pH 6.0 to 7.5.

2.7.7. Determination of kinetic parameters

Kinetic parameters, K_M , k_{cat} , and V_{max} of Inu-ISO3 for agavin, chicory inulin, and sucrose as substrates were determined by assaying the activity of the enzyme Inu-ISO3 in different concentrations of each substrate (agavin 0.93–5.58 mM, chicory inulin 0.25–2.5 mM, sucrose 29–291 mM). The reactions were carried out at the best condition for each substrate; agavin pH 5.5 and 50 °C, chicory inulin pH 4.5 and 50 °C and sucrose 4.5 and 60 °C. Nonlinear-regression analysis was applied to estimate the kinetic parameters by least-squares regression in GraphPad Prism 8™.

2.8. Structure analysis

Inulinase genes from *K. marxianus* strains ISO3, NRRL-Y-1109 and DER, were PCR-amplified using the primers FInu 5'-GCC GCG GCA AAG GAG TCA GTG CT-3' and RInu 5'-GCT CTA GAC AAA CGT TAA ATT GGG TAA CG-3', and the amplicons were sequenced with the same primers. DNA translation of the amplicons was used to compare amino acid sequences by alignment, including the inulinase from the strain DMKU3-1042, the only *K. marxianus* inulinase with crystallographic structure (PDB 6J0T).

3. Results and discussion

3.1. Molecular identification of strain ISO3

The ITS-PCR product from strain ISO3 was sequenced and deposited in GenBank (MK493443). The sequence was compared to GenBank with BLAST [19] and identified as *K. marxianus*. This yeast is part of the endogenous microbiota of agave plants and aguamiel [20], and therefore can also be found in the bagasse residua, byproduct of the Tequila production process. *K. marxianus* has a great potential in industrial biotechnology because of its thermotolerance, fast growth, ability to use a wide spectrum of carbon sources after 48 h and because it produces several extracellular enzymes, for example, lactases, pectinases, glucosidases, and inulinases. In addition, several strains of this yeast have obtained the GRAS (Generally Recognized as Safe) status [21].

3.2. Effect of carbon source on the inulinase production

The production of inulinase activity by *K. marxianus* strain ISO3 was evaluated with different carbon sources (Fig. 1). Although agavin produced a lower amount of biomass than glucose, fructose, sucrose or FOS, and even the most extended lag phase (data not shown), inulinase activity was higher than with the other substrates. Inulinase activity in agavin is higher than in other carbon sources at all fermentation times. This induction pattern has also been observed for another *K. marxianus* inulinase [22,23]. Sokolenko & Karpechenko demonstrated that the lower production of inulinase from *K. marxianus* CDBB L 278 in a medium with glucose obey to the repression of the gene INU1. They also showed that there is a better production of inulinases when the yeast grows with inulin or sucrose as the sole carbon source [24]. These observations are in agreement with our results, as inulinase activities were always higher with agavin or sucrose than with glucose. Therefore, agavin was used as the carbon source to produce inulinase for purification.

3.3. Purification of inulinase

K. marxianus ISO3 inulinase was purified to homogeneity in a three-step procedure: ultrafiltration, anionic exchange, and finally molecular exclusion chromatography. Ultrafiltration was carried out in a 30 kDa MWCO regenerated cellulose membrane.

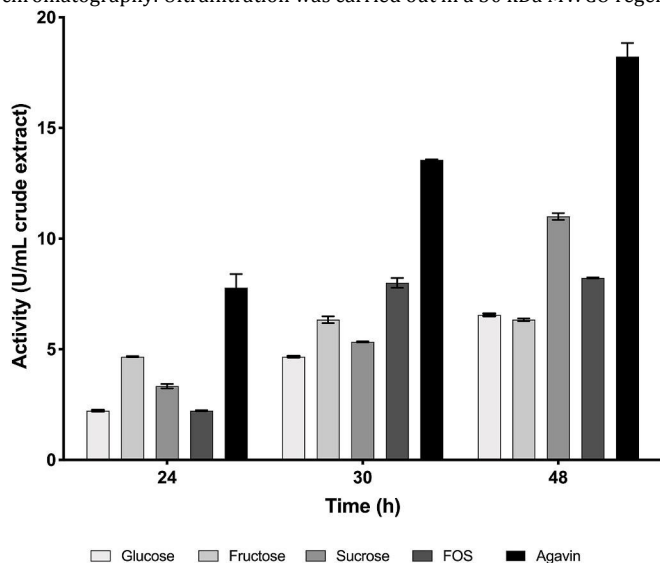


Fig. 1. Effect of carbon source on inulinolytic activity production.

Glucose, Fructose, Sucrose, FOS, and Agavin. The enzymatic reaction was carried out with agavin 1% (m/v) at 50 °C, pH 5.5 by 10 min at 300 rpm in a

total volume of 1 mL.

In this step, about 87% of the total protein is lost with a concomitant loss of about 50% of the activity. It is plausible that the inulinolytic enzyme remained bound to the cellulose membrane because of its carbohydrate-binding nature, or bound to other proteins that in turn are retained in the membrane. The anionic exchange chromatography was carried out in a column packed with resin DEAE-Sepharose Fast Flow at pH 7 and eluted with a one-step gradient of NaCl. To establish the one-step elution process, a linear gradient of NaCl to 2 M was performed previously, and the collected fractions were assayed for inulinase activity. Enzymatic activity was detected in just one fraction that eluted at 7% of 2 M NaCl (140 mM). This purification step increased the concentration of inulinase; however, it could not separate a second protein present in the fractions with inulinase activity (Fig. 2).

Fractions with activity were loaded into a size exclusion column (Superdex 200) and the SDS-PAGE analysis of the main peak revealed an electrophoretically homogeneous protein (Fig. 2) with a specific activity of 1400.2 U/mg towards agavin (Table 1). Although enzyme activity

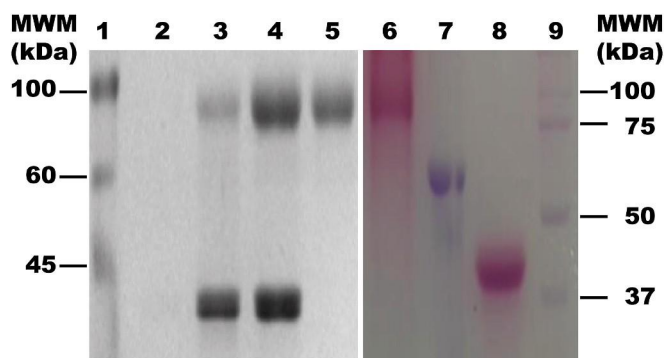


Fig. 2. SDS-PAGE (10%) analysis performed at each purification step (Lanes 1–5). Lane 1, molecular marker; lane 2, crude extract; lane 3, concentrated extract; lane 4, partial purification by anionic exchange chromatography; lane 5, purification by molecular exclusion chromatography. SDS PAGE (10%) analysis of native and deglycosylated enzyme stained by the periodic acid/Schiff method (Lanes 6–9). Lane 6, native inulinase; lane 7, deglycosylated inulinase; lane 8, positive glycosylated control (horseradish peroxidase); lane 9, molecular weight marker. In each lane were loaded approximately 30 μ g of protein.

and purification fold were not increased in this last step, the second protein in the electrophoretic pattern was removed.

The purified enzyme exhibited an I/S ratio (ratio of activity with agavin to activity with sucrose) of 1.39 demonstrating that this is a true inulinase. The results from thin-layer chromatography analysis of the hydrolysis products indicated that the hydrolysis of agavin yielded fructose as the main product (Fig.S1), demonstrating that the enzyme has exo-inulinase activity.

3.4. Biochemical characterization of *K. marxianus* ISO3 inulinase

K. marxianus ISO3 inulinase (Inu-ISO3) displayed a molecular weight of 89.4 kDa by SDS-PAGE (Fig. 2). In contrast, the estimated molecular weight was 256 kDa by SEC in a calibrated superdex 200 column (Fig. S2). This result suggests that the active form of the enzyme is a dimer. Molecular weights of inulinases from *K. marxianus* are in a range from 42 to 450 kDa [25], and some of them are dimeric, with molecular weights of 200 and 250 kDa, for *K. marxianus* DSM 70106 [26] and *K. marxianus* isolated from a mezcal production process [27].

DLS analysis of Inu-ISO3 shows a monodisperse peak with a diameter of 11.3 \pm 0.1 nm (data not shown). This value corresponds to a molecular weight of 232 kDa for a globular protein, close to that observed by SEC. Another inulinase from *K. marxianus* has been reported to present a dimeric structure, with a major axis diameter of 12.2 nm [28]. Finally, the major axis diameter for the crystal structure of the homodimeric inulinase of *K. marxianus* DMKU3-1042 (PDB 6J0T) is 9.9 nm, which is in good agreement with our measurements.

Differences between the observed size by SEC and DLS may come from the shape and glycosylation of the enzyme. As is well documented, *K. marxianus* produces glycosylated inulinases [26,29]. The wild-type enzyme (89.4 kDa) was stained by the periodic acid/Schiff reaction, revealing its glycosylated nature. After deglycosylation, its molecular weight was reduced to 65 kDa and was no longer stained by the Schiff method (Fig. 2). Besides, the isoelectric point (pI) of Inu-ISO3 was evaluated by isoelectric focusing, finding a pI of 4.6, a value that is close to the observed pI for other inulinases (3.9–4.3) produced by different strains of *K. marxianus* [26].

3.5. Thermostability

Thermal stability of inulinases is an essential property for its industrial application, as processing inulin or agavin at high temperature increases their solubility and reduces the probability of microbial contamination. The thermostability of Inu-ISO3 was measured through the loss of activity and changes in its hydrodynamic diameter by DLS.

After 1 h of incubation at 40 $^{\circ}$ C, the enzyme activity decreased by only 10%. However, at 50 $^{\circ}$ C residual activity dropped to 40%, and only to 2% when the enzyme was incubated at 60 $^{\circ}$ C by 1 h (Fig. 3A). At 70 $^{\circ}$ C the loss of activity occurred in less than 10 min. Size analysis by DLS indicates that the diameter of Inu-ISO3 remains stable from 25 to 60 $^{\circ}$ C, and presents just a slight increase at 70 $^{\circ}$ C (Fig. 3B). This modest change in size suggests that the enzyme inactivation occurs neither by dissociation of the dimeric enzyme nor by significant changes in the overall compactness of the protein. Therefore, the loss of activity may be related to small structural changes in the enzyme.

3.6. Effect of temperature and pH on the inulinase activity of Inu-ISO3

The hydrolytic activity of Inu-ISO3 was investigated over a wide range of temperatures and pH values, from 25 to 70 °C and from 3.5 to 7.5 respectively. When agavin was used as a substrate, the enzyme displayed activity along the range of temperature assayed, with the highest enzymatic activity at 50 °C and pH 5.5 (Fig. 4A). Activity at different pH values showed a narrow peak centered on pH 5.5, keeping up to 50% of its activity at pH 7.5. In contrast, at pH below 4.5 the activity dropped drastically and was undetectable at pH 3.5. Using Table 1

Purification of *K. marxianus* ISO3 inulinase.

Purification step	Volume (mL)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification factor	Yield recovery (%)
Crude extract	703	0.262	69.8	266.4	1.00	100.00
Ultrafiltration	14	0.032	30.8	963.3	3.62	44.16
Ionic exchange	2	0.004	5.6	1398.0	5.25	8.01
Size exclusion	1	0.002	2.8	1400.2	5.26	4.01

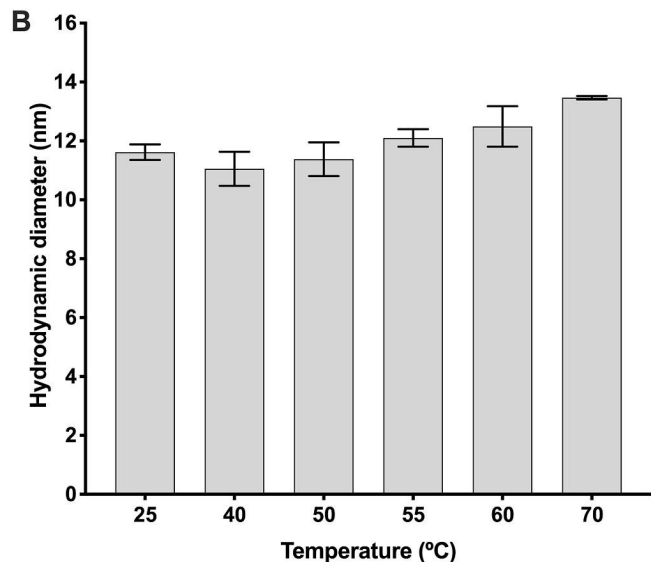
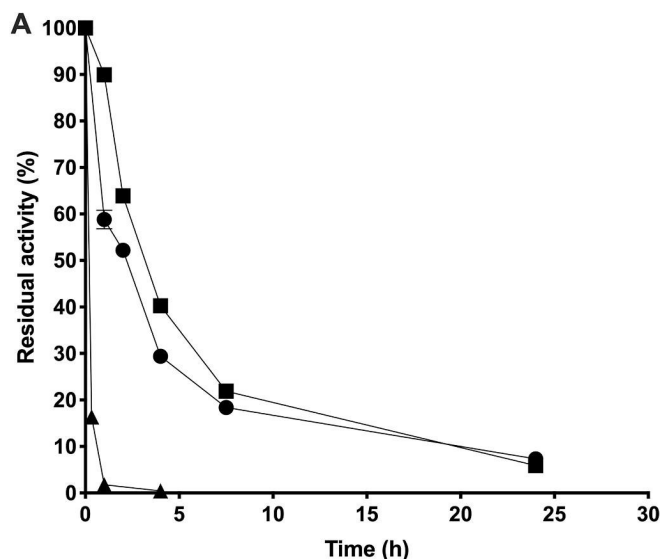


Fig. 3. A) Residual activity after incubation of Inu-ISO3 at different temperatures (25 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C). All assays were carried out in phosphate buffer pH 7.2. Inu-ISO3 was incubated by 10 min. The hydrolysis reaction was performed with agavin 1.0% (m/v) in phosphate buffer pH 5.5 at 50 °C. B) Hydrodynamic diameter of Inu-ISO3 at different temperatures (from 25 to 70 °C) measured by DLS.

inulin from chicory as the substrate, the best temperature and pH for enzyme activity were 50 °C and 4.5 (Fig. 4B). Other authors have reported similar values of pH and temperature optima for inulinases from *K. marxianus* with this substrate [27,30,31]. Inu-ISO3 can also use sucrose as a substrate, displaying a maximum activity at 60 °C and pH 4.5 (Fig. 4C). Cazetta and coworkers reported a range of maximum activity from 45 to 60 °C at pH 4 towards sucrose for an inulinase from *K. marxianus* [30]. The differences between optimum pH of activity for

different substrates could be a consequence of changes in the ionization state of residues responsible for fine structural traits in the active site, as suggested for other enzymes able to use more than one substrate [32]. Inu-ISO3 exhibited its maximum activity with chicory inulin (1400.2 U/mg)

followed by agavin (231.1 U/mg) and sucrose (226.6 U/mg). The effect of different concentrations and substrates, like agavin, chicory inulin, and sucrose, on the hydrolytic activity of Inu-ISO3 were tested. The resulting isotherms (Fig. S3) were fitted to the Michaelis-Menten equation to determine the kinetic parameters (Table 2). The low K_M and high catalytic efficiency (k_{cat}/K_M) for chicory inulin revealed the origin of its high activity toward this substrate. The K_M value was close to that reported by Singh and coworkers [33], but smaller than that reported by the group of Arrizon [27], 54% less, using inulin from chicory with a molecular weight of 5000 kDa. However, when comparing the catalytic efficiency of Inu-ISO3 with the fructanase from *K. marxianus* on chicory inulin as the substrate [27], Inu-ISO3 presented a catalytic efficiency ~3510-fold higher. In the same line, the catalytic efficiency determined with agavin was ~45-fold higher, even though the molecular weight of agavin used in our study was higher than that reported previously. The difference in the catalytic efficiency between inulin from chicory and agavin can be explained by the access of the complex branched structure of agavin to the active site.

3.7. Activity of inulinases from different *K. marxianus* strains

To compare the enzymatic activity of Inu-ISO3 on agavin, 2 inulinases from *K. marxianus* (DER and NRRL-Y-1109) were purified using the same protocol used for Inu-ISO3. In addition, the purified exo-inulinase from Novo 960, a commercial enzyme from *Aspergillus* sp., was included. The maximum activity was showed by Inu-ISO3 followed by inulinases from NRRL-Y-1109, DER, and finally the exo-inulinase from Novo960, displaying 85, 70, and 36% respectively compared to the specific activity of Inu-ISO (Fig. 5).

To gain insight from the structure of the inulinases, the *Inu* genes coding for the enzymes from strains ISO3, DER, and NRRL-Y-1109 were amplified by PCR, and the amplicons were subjected to DNA sequencing. All sequences, including that from the inulinase from *K. marxianus* DMKU3-1042 (GenBank BA038140) whose crystallographic structure was recently released, were translated to protein and aligned with Clustal 2.1. Inulinases from strains ISO3 and DMKU3-1024 are 100% identical in the region studied (residues 33–556), while the protein from strain DER has 522/524 identities (99.6%) and that from strain NRRL-Y-109 has 518/524 identities (98.8%), and a single-residue gap in position S223 of the strain ISO3. These seven changes in the inulinase from strain NRRL-Y-109 (Q164E, S167T, S223-, A250V, S254 N, D299G, N479T) produced only a marginal decrease in the activity of the enzyme. In

contrast, the two contiguous changes in the enzyme from strain DER (E64K, D65Y) produced a more evident reduction in the activity. Positions 64 and 65 are located in a loop connecting two antiparallel β -strains in one of the propels of the 5-fold β propel, at the distal side of the active site. It is reasonable that the decreased activity observed may be associated to changes in the geometry or dynamics of the whole N-terminal domain, and deserve further analysis.

4. Conclusions

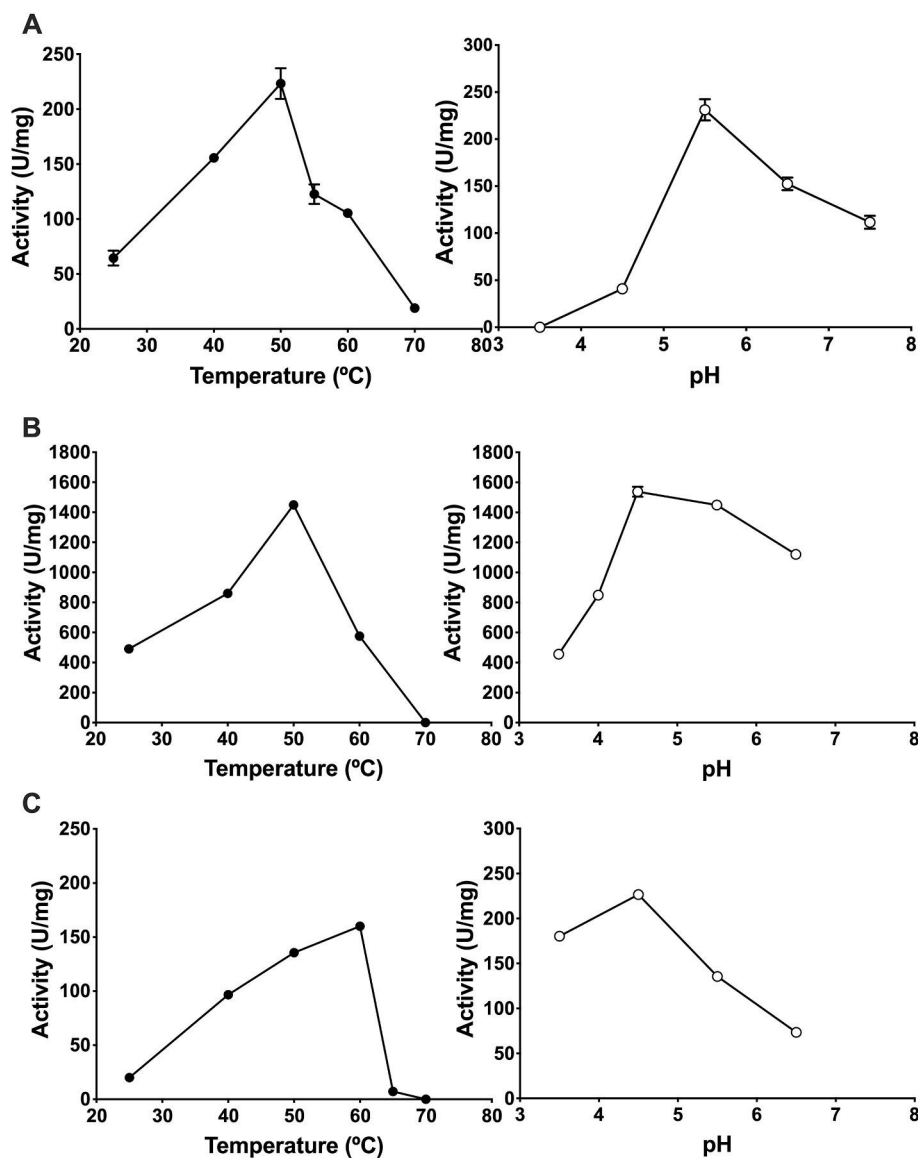


Fig. 4. Effect of temperature and pH on the INU-ISO3 activity using A) agavin, B) inulin from chicory, and C) sucrose as substrate. The reaction was carried out by 20 min with agavin 1% (w/v), phosphate and acetate buffer 50 mM or solutions above pH 5.5 and below 5, respectively.

Table 2

Kinetic parameters obtained for the hydrolysis of different substrates by *K. marxianus* enzymes.

Substrate	Molecular weight (Da)	K_M (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($s^{-1} mM^{-1}$)	R^{2d}	Reference
Inulin ^a	5000 ^c	3.9 ± 0.3	1380.1 ± 10.3	351.2 ± 1.6	0.96	This work
	5000 ^c	7.2 ± 0.3	0.70 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.99	Arrizon et al., 2011
	ND	3.4	ND	ND	ND	Singh et al., 2007
Agavin	3874 ^c	8.3 ± 0.6	339.0 ± 2.4	40.8 ± 0.7	0.99	This work
Fructans ^b	2690 ^c	12.9 ± 0.4	11.7 ± 0.6	0.9 ± 0.0	0.98	Arrizon et al., 2011
	342	97.3 ± 2.5	414.4 ± 1.8	4.3 ± 0.2	0.96	This work
Sucrose	342	29.1 ± 3.5	37.0 ± 1.2	1.3 ± 0.1	0.98	Arrizon et al., 2011
	342	40.2	ND	ND	ND	Cruz-Guerrero et al., 1995
	342	15.7	ND	ND	ND	Rouwenhorst et al., 1988
	342	15.7	ND	ND	ND	Rouwenhorst et al., 1988

^a From *Dahlia* tubers.

^b From *A. tequilana*.

^c Average molecular weight.

^d Regression coefficient for Michaelis-Menten non-linear fit.

produces a dimeric β -D-fructan fructohydrolase, with exo-inulinase activity on agavin and inulin. The enzyme, Inu-ISO3, was purified and characterized exhibiting a higher catalytic efficiency on inulin from

chicory and agavin than other enzymes previously reported. The temperature and pH-activity profiles of this enzyme make it an excellent candidate for industrial use. Further studies on the immobilization and

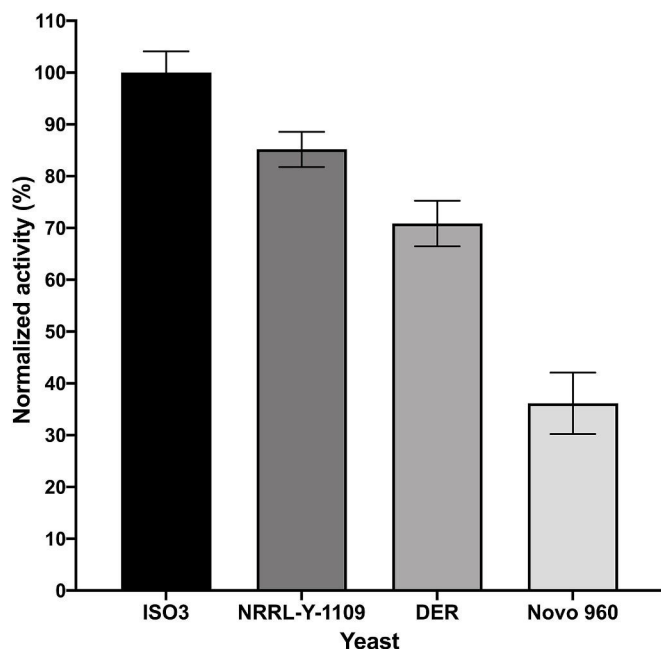


Fig. 5. Comparison of enzyme activity from different *K. marxianus* yeasts and a commercial exo-inulinase. The reaction was performed on agavin 1% (w/v), pH 5.5 at 50 °C and 500 rpm for 20 min.

stabilization of this enzyme may increase its value as a bioresource for the complete use of agave plants and other agro-residues containing inulins.

CRedit authorship contribution statement

Jonathan Trapala: Investigation, Formal analysis, Methodology. **Ismael Bustos-Jaimes:** Writing - review & editing. **Paloma Manzanares:** Resources. **Eduardo Barzana:** Resources. **Carmina Montiel:** Conceptualization, Validation, Resources, Supervision, Project administration, Funding acquisition, Writing - original draft.

Acknowledgements

This work was supported by DGAPA-UNAM (Grant PAPIIT IA 204118), CONACyT (Grant No. CB-2011/167507). J. Trapala acknowledges financial support from CONACyT through scholarship. We thank the Consejo Regulador del Tequila and Tequila Patrón, Jalisco, México, for supplying bagasse samples.

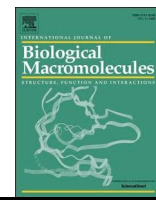
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105718>.

References

- [1] M. Arand, A. Golubev, J. Neto, I. Polikarpov, R. Wattiez, O. Korneeva, E. Eneyskaya, A. Kulminskaya, K. Shishliannikov, Purification, characterization, gene cloning and preliminary X-ray data of the exo-inulinase from *Aspergillus awamori*, *Biochem. J.* 362 (2002) 131–135, <https://doi.org/10.1042/bj3620131>.
- [2] R. Nagem, A. Rojas, A. Golubev M, O. Korneeva, E. Eneyskaya, A. Kulminskaya, K. Neustroev, I. Polikarpov, Crystal structure of exoinulinase from *Aspergillus awamori*: the enzyme fold and structural determinants of substrate recognition, *J. Mol. Biol.* 344 (2004) 471–480, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.09.024>.
- [3] M. Verhaest, W. Ende, K. Roy, C. De Ranter, A. Laere, A. Rabijns, X-ray diffraction structure of a plant glycosyl hydrolase family 32 protein: fructan 1-exohydrolase IIa of *Cichorium intybus*, *Plant J.* 41 (2005) 400–441, <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02304.x>.
- [4] M. Alvaro-Benito, A. Polo, B. González, M. Fernánde-Lobato, J. Sanz-Aparicio, Structural and kinetic analysis of *Schwanniomyces occidentalis* invertase reveals a new oligomerization pattern and the role of its supplementary domain in substrate binding, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 13930–13941, <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.095430>.
- [5] A. Bujacz, M. Jedrzejczak-Krzepkowska, S. Bielecki, I. Redzyna, G. Bujacz, Crystal structures of the apo form of b-fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* and its complex with fructose, *FEBS J.* 278 (2011) 1728–1744, <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08098.x>.
- [6] J. Pouyez, A. Mayard, A.M. Vandamme, G. Roussel, E. Perpete, J. Wouters, I. Housen, C. Michaux, First crystal structure of an endo-inulinase, inu2, from *aspergillus ficuum*: discovery of an extra-pocket in the catalytic domain responsible for its endo-activity, *Biochimie* 94 (2012) 2423–2430, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.06.020>.
- [7] W. Van den Ende, B. De Coninck, A. Van Laere, Plant fructan exohydrolases: a role in signaling and defense? *Trends Plant Sci.* 9 (2004) 524–528, <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.09.008>.
- [8] R. Singh, K. Chauhan, Production, purification, characterization and applications of fungal inulinases, *Curr. Biotechnol.* 7 (2018) 242–260, <https://doi.org/10.2174/2211550105666160512142330>.
- [9] I. Muñoz-Gutiérrez, M. Rodríguez-Alegría, A. López-Munguía, Kinetic behavior and specificity of b-fructosidases in the hydrolysis of plant and microbial fructans, *Process Biochem.* 44 (2009) 891–898, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.04.013>.

- [10] M.G. Lo'pez, N.A. Mancilla-Margalli, G. Mendoza-Díaz, Molecular structures of fructans from agave tequilana weber var. azul, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 7835–7840. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf030383v>.
- [11] A. Huazano-García, M.G. Lo'pez, Enzymatic hydrolysis of agavins to generate branched fructooligosaccharides (a-FOS), *Appl. Biochem. Biotechnol.* 184 (2018) 25–34. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2526-0>.
- [12] D. Lima, P. Fernandes, D. Nascimento, R. Ribeiro, S. de Assis, Fructose syrup: a biotechnology asset, *Food Technol. Biotechnol.* 49 (2011) 424–434. https://hrcak.srce.hr/index.php/show_clanak&id_clanak_jezik=111351.
- [13] J. Coitinho, V. Guimaraes, M. Almeida, D. Falkoski, J. Queiro'z, S. Resende, Characterization of an exoinulinase produced by *Aspergillus terreus* CCT 4083 grown on sugar cane bagasse, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 8386–8391. <https://doi.org/10.1021/jf1011159>.
- [14] R. Singh, K. Chauhan, R. Singh, Enzymatic approaches for the synthesis of high fructose syrup, in: S.K. Gahlawat, et al. (Eds.), *Plant Biotechnology: Recent Advancements and Developments*, Springer Nature Singapore, 2017, pp. 189–211. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4732-9_10.
- [15] P. Lappe-Oliveras, R. Moreno-Terrazas, J. Arrizo'n-Gavino, T. Herrera-Sua'ez, A. García-Mendoza, A. Gschaelder-Mathis, Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages, *FEMS Yeast Res.* 8 (2008) 1037–1052. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00430.x>.
- [16] C. Schoch, K. Seifert, S. Hundorf, V. Robert, J. Spouge, E. Levesque, W. Chen, Fungal Barcoding Consortium, Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109 (2012) 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>.
- [17] T. Ghose, Measurement of cellulase activities, *Pure Appl. Chem.* 59 (1987) 257–268. <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>.
- [18] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- [19] S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman, Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* 215 (1990) 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- [20] M. García-Aguirre, V. Sa'enz-A'lvarez, F. Rodríguez-Soto, V. Magueyal, E. Botello-A'lvarez, H. Jimenez-Islas, M. Ca'rdenas-Manríquez, R. Rico-Martínez, J. Navarrete-Bolan'os, Strategy for biotechnological process design applied to the enzymatic hydrolysis of Agave fructooligosaccharides to obtain fructose-rich syrups, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 10205–10210. <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jf902855q>.
- [21] G. Fonseca, E. Heinzle, C. Wittman, A. Gombert, The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79 (2008) 339–354. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1458-6>.
- [22] N. Lertwattanasakul, N. Rodrussamee, S. Suprayogi, Limtong, P. Thanokeo, T. Kosaka, M. Yamada, Utilization capability of sucrose, raffinose and inulin and its less-sensitiveness to glucose repression in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042, *Amb. Express* 1 (2011) 1–11. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-20>.
- [23] M. Germec, I. Turhan, Evaluation of carbon sources for the production of inulinase by *Aspergillus Niger* A42 and its characterization, *Bioproc. Biosyst. Eng.* 42 (2019) 1993–2005. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02192-9>.
- [24] G. Sokolenko, N. Karpechenko, Expression of inulinase genes in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*, *Microbiology* 84 (2015) 23–27. <https://doi.org/10.1134/S0026261715010142>.
- [25] M. Holyavka, V. Artyukhov, T. Kovalev, Structural and functional properties of inulinases: a review, *Biocatal. Biotransform.* 34 (2016) 1–17. <https://doi.org/10.1080/10242422.2016.1196486>.
- [26] A. Pessoa, M. Vitolo, Separation of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using reversed micellar extraction, *Biotechnol. Tech.* 11 (1997) 421–422. <https://doi.org/10.1023/A:1018472924041>.
- [27] J. Arrizon, S. Morel, A. Gschaelder, P. Monsan, Purification and substrate specificities of a fructanase from *Kluyveromyces marxianus* isolated from fermentation process of Mezcal, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 2398–3303. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.071>. M.G. Holyavka, T. Kovaleva, M. Grechkina, I. Ostankova, V. Artyukhov, Inulinases from various producers: the features or their permolecular organization, *Appl. Biochem. Microbiol.* 50 (2014) 10–16. <https://doi.org/10.1134/S0003683814010050>.
- [28] R. Nagem, A. Rojas, A. Golubev, O. Korneeva, E. Eneyskaya, A. Kulminskaya, K. Neustroev, I. Polikarpov, Crystal structure of Exo-inulinase from *Aspergillus awamori*: the enzyme fold and structural determinants of substrate recognition, *J. Mol. Biol.* 344 (2004) 471–480. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.09.024>.
- [29] M. Cazetta, M. Martins, R. Monti, J. Contiero, Yacon (*Polymnia sanchifolia*) extract as a substrate to produce inulinase by *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, *J. Food Eng.* 66 (2005) 301–305. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.03.022>.
- [30] S. Jain, P. Jain, N. Kango, Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using dahlia tuber extract, *Braz. J. Microbiol.* 43 (2012) 62–69. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000100007>.
- [31] S. Yuan, K. Le Roy, T. Venken, W. Lammems, W. Van den Ende, M. De Maeyer, pKa modulation of the acid/base catalyst within GH32 and GH68: a role in substrate/ inhibitor specificity? *PLoS One* 5 (2012), e37453. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037453>.
- [32] R. Singh, R. Dhaliwal, M. Puri, Partial purification and characterization of exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 for preparation of high-fructose syrup, *J. Microbiol. Biotechnol.* 17 (2007).



Relevance of aromatic and polar amino acids in the specificity of Inulinase ISO3 from *Kluyveromyces marxianus*: A molecular dynamics approach with an experimental verification

Jonathan Trapala ^a, [Martín González-Andrade](#) ^b, [Clarita Olvera](#) ^c, [Maribel Cayetano-Cruz](#) ^b, Julia Sanz-Aparicio ^d, [Elena Jimenez-Ortega](#) ^d, [Ismael Bustos-Jaimes](#) ^b, [Carmina Montiel](#) ^{a,*}

^a Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México City 04510, Mexico

^b Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, México City 04510, Mexico

^c Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico

^d Departamento de Cristalografía y Biología Estructural, Instituto de Química-Física Rocasolano, CSIC, Serrano 119, 28006 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Inulinase

Molecular dynamics

Site-directed mutagenesis Hydrolysis of agavin

ABSTRACT

The Inulinase from *Kluyveromyces marxianus* ISO3 (Inu-ISO3) is an enzyme able to hydrolyze linear fructans such as chicory inulin as well as branched fructans like agavin. This enzyme was cloned and expressed in *Komagataella pastoris* to study the role of selected aromatic and polar residues in the catalytic pocket by Alanine scanning. Molecular dynamics (MD) simulations and enzyme kinetics analysis were performed to study the functional consequences of these amino acid substitutions.

Site-directed mutagenesis was used to construct the mutants of the enzyme after carrying out the MD simulations between Inu-ISO3 and its substrates. Mutation Trp79:Ala resulted in the total loss of activity when fructans were used as substrates, while with sucrose, the activity decreased by 98 %. In contrast, the mutations Phe113:Ala and Gln236:Ala increased the invertase activity when sucrose was used as a substrate. Although these amino acids are not part of the conserved motifs where the catalytic triad is located, they are essential for the enzyme's activity. *In silico* and experimental approaches corroborate the relevance of these residues for substrate binding and their influence on enzymatic activity.

1. Introduction

Inulinases are a group of enzymes present in bacteria, plants, fungi, and yeast. Their principal function is to degrade inulin, a linear polysaccharide of fructose with β -(2 \rightarrow 1) linkages, a reserve carbohydrate in plants, to obtain fructose or fructooligosaccharides. Inulinases are classified as *exo*- or *endo*-inulinases. Exo-inulinases (β -D-fructan fructosidase, EC 3.2.1.80) hydrolyze the terminal fructosyl residues from the inulin, obtaining fructose as the main product [1]. On the other hand, *endo*-inulinases (inulinase, EC 3.2.1.7) hydrolyze inulin to produce fructooligosaccharides (FOS) composed of between three and ten units of fructose [2]. Both products, fructose and FOS have high values in the food and pharmaceutical industries; for example, fructose syrup has a good position in the sugar market and is the most used sweetener in the food industry [3]. Moreover, FOS are a good food supplement as a prebiotic for gastric health; the global market of FOS was estimated at

134 kt worldwide in 2015 and is expected to grow in the following years [4,5].

Nowadays, inulin is the most common polysaccharide used for the production of ethanol production, fructose syrup, and FOS [6] (Fig. 1A). This polymer is present in about 36,000 species of plants, but the common sources are Jerusalem artichoke, onions, chicory, and dandelion, being chicory roots the wealthiest source of inulin [7,8]. The leading producer countries of this sweetener are Belgium, Netherlands, and Chile, with 93 % of all markets.

A similar reserve carbohydrate is agavin, a neoinulin molecule produced by agave plants, containing β -(2 \rightarrow 1) and β -(2 \rightarrow 6) linkages between β -D-fructose units (Fig. 1) [9]. However, agavin is not widely used to produce FOS or fructose due to the complexity of its structure and the low activity that commercial hydrolytic enzymes have against this substrate. An alternative for hydrolyzing this compound is the chemical hydrolysis using alkali or acid. However, these reactions

* Corresponding author.

E-mail address: carmina@unam.mx (C. Montiel).

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124734>

Received 2 March 2023; Received in revised form 19 April 2023; Accepted 30 April 2023

Available online 5 May 2023

0141-8130/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved. generate secondary products like hydroxymethylfurfural or furfuraldehyde, both toxic and dangerous for people's health [10,11].

An enzyme capable of hydrolyzing agavin is the inulinase from *K. marxianus* (Inu-ISO3) isolated from agave residues [12]. This enzyme has shown high activity against agavin compared with other inulinases. The gene coding for Inu-ISO3 has been cloned, and its amino acid sequence elucidated. The Inu-ISO3 structure has 100 % identity with the inulinase from *K. marxianus* DMKU3-1042 (6J0T). The enzyme is homodimeric and has a single *N*-glycosylation in each chain.

This enzyme belongs to the glycoside hydrolase family 32 in the Carbohydrate Active Enzyme database (CAZY). All proteins in this family have similar structures composed by two domains; the N-terminal domain has a five-bladed β -propeller, and the C-terminal domain is formed by two β -sheets. The active site is in the β -propeller domain and is characterized by three highly conserved motifs, WMNDPNG, RDP, and EC. **D** in the first motif acts as a nucleophile, **D** in the second motif is believed to act as a transition state stabilizer, and finally, **E** in the EC motif acts as an acid/base catalyst [13–16].

Until now, the knowledge of the structure of this enzyme is limited to understanding the reaction mechanism and the function of the catalytic amino acids. Site-directed mutagenesis experiments were performed in other GH32 enzymes to modify the specificity, like the invertase from *Arabidopsis thaliana* or the fructan 1-exohydrolase from *Cichorium intybus*. For example, the single substitution of Asp239 by Ala in a cell-wall invertase from *A. thaliana* changed its invertase to an *exo*-hydrolase activity [17]. To understand the role of sucrose as a regulator of the fructan 1-exohydrolase from *C. intybus*, Trp82, or Ser101 were mutated, noticing that the inhibition by sucrose was modified [18]. Other works try to understand the difference between the two-enzymatic activities that a fructofuranosidase shows depending on whether a molecule of water (hydrolysis) or an oligosaccharide (transference) accepts the fructose released from the fructan hydrolysis. For example, mutation of Gln228 or Asn254 in the β -fructofuranosidase of *Schawanniomyces occidentalis* modified the hydrolysis/transference ratio, favoring the transferase activity. Those residues are involved in the binding of two units of fructose of the inulin and the modulation of the specificity of the

In this research, selected residues in the active site pocket of Inu-ISO3 were analyzed *in silico*. The roles of residues interacting with substrates in critical positions were studied by site-directed mutation both *in silico* and *in vitro*, revealing their impact on enzyme catalysis.

2. Materials and methods

2.1. Materials

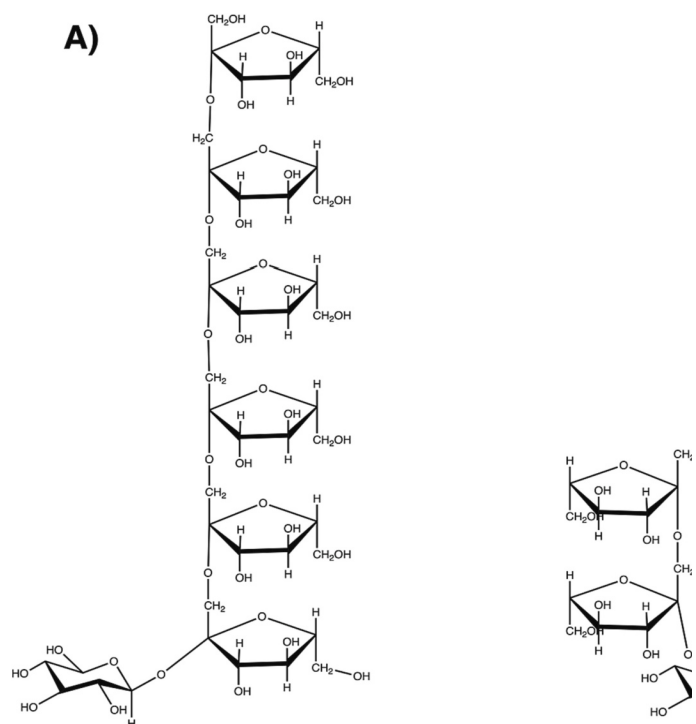
Materials for yeast culture media, chicory inulin, and sucrose were purchased from Sigma-Aldrich (USA). Agavin from *Agave tequilana* weber var. Azul was kindly provided by Nektli S.A. Jalisco, M^éxico. The average molecular weight of agavin (3874 Da) and inulin (5000 Da) were determined by size exclusion chromatography (SEC).

2.2. Molecular dynamics simulations

Inulinase-substrate complexes were built using the inulinase structure from *K. marxianus* (6J0T). The coordinates of ligands were obtained from the complex of *S. occidentalis* β -fructofuranosidase with inulin (3U14) and the complex of *C. intybus* fructan 1-exohydrolase with sucrose (2ADD). Agavin was created using Spartan software v.10 using inulin and levan as a template. Inulinase-inulin complex was built, overlapping the structure of inulinase from *K. marxianus* (6J0T) with the complex of β -fructofuranosidase with inulin (3U14) after the enzyme of *S. occidentalis* was removed, and the complex between inulinase Inu-ISO3 and inulin was saved in PDB format. The inulinase-sucrose complex was generated in the same form; in the case of the complex with agavin, it was constructed overlapping the substrates (inulin and agavin), and finally, inulin was removed.

The MD simulations were performed using GROMACS software V 5.14 [20] based on the methodology proposed by the Bevans Lab [21] using the Amber 99SB force field.

The protein-substrate complex solvated in water was placed in a cubic simulation box of 1.4 nm per side. All simulations were balanced



by a fair number of Na^+ and Cl^- ions to make the system neutral.

Topology and coordinates parameter files for ligands were created using Antechamber and Acypype packages [22]. A steepest descent algorithm with 50,000 steps was applied to energy minimization of the system. The V-rescale, a modified Berenson method [23], and Parrinello-Rahman [24] algorithms were used to maintain constant the temperature and pressure of the system (323 K and 1 bar). The minimization energy, temperature, and pressure were graphed to observe the stability of the system (supplementary data).

Simulations were performed for 100 ns for each complex, and the

Molecular Mechanics energies combined with the Poisson-Boltzmann and Surface Area (MMPBSA) analysis was carried out in a period in which the complex was stable (five hundred frames) using the g_mmpbsa package. The method involves the calculation of three energy components: the analysis of potential energy in a vacuum, the measure of polar solvation energy, and the calculation of non-polar solvation energy. After calculating the three energy components, the binding energy of the complex can be determined using Excel program [25,26].

2.3. Wild-type Inu-ISO3 purification

Strain *K. marxianus* ISO3, isolated from Blue Agave Bagasse, was cultured in 1 L of media consisting of (% w/v): yeast extract 0.2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1, KCl 0.05, and KH_2PO_4 0.1, pH 5.0 added with 0.5 % agavin as the sole carbon source, pH 5, for 64 h at 30 °C, 150 rpm. Then cells were harvested by centrifugation at 10,000 rpm for 15 min at 4 °C. The supernatant was concentrated using lyophilization and restored with 20 mL of water. Finally, the concentrated enzyme was further purified by size-exclusion chromatography in a Superdex 200 (30 mL GE Healthcare, USA), in an FPLC A⁺kta purifier, previously equilibrated with phosphate buffer 50 mM pH 7.2, added with 0.5 M NaCl. Elution was carried out at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹. Fractions with activity were pooled, and the purity of the enzyme was evaluated by SDS-PAGE. The protein concentration was determined by the Bradford method against a standard calibration curve for bovine serum albumin (BSA).

2.4. INU-ISO3 gene cloning and expression

The gene of inulinase was amplified by PCR from the genomic DNA of

Table 1
Mutagenic primers.

Mutant	Primers
Trp79:Ala	Forward: 5' cc acg atc gct ggt act cca ttg tac tgg ggt 3' Reverse: 5' gg agt acc agc gat cgt ggc tgc tgg gtt 3'
Phe113:Ala	Forward: 5' ggt gcg gct agt ggt agt atg gtt atc ga 3' Reverse: 5' t acc act agc cgc acc agc gtc g 3'
Thr235:Ala	Forward: 5' g act ggt gct caa tac gaa tgc cca ggt ct 3'

Reverse: 5' ttc gta ttg agc acc agt cca gcc gtg g 3'
Forward: 5' act gct acc gct tac gaa tgc cca ggt cta 3'
Reverse: 5' gca ttc gta agc ggt acc agt cca gcc gtg 3'

K. marxianus ISO3, using two specific primers with restriction sites; Forward: *Xba*I (5' GCT CTA GAC AAA CGT TAA ATT GGG TAA CG'3) and Reverse: *Sac*II (5' GCCGCGCAAAGGAGTCAGTGCT'3). Then, the PCR product of the inulinase (1668 bp) was digested with *Xba*I and *Sac*II and ligated into the pPICZ α B previously digested with the same restriction enzymes to get the recombinant pPICZ α B-INU-ISO3. The gene sequence was confirmed by DNA sequencing (Laragen Inc., USA).

The recombinant vector pPICZ α B-INU-ISO3 was linearized with *Pme*I, and transformed by electroporation into *Komagataella pastoris* X33. Positive transformants were grown in the YPDS (20 g L⁻¹ peptone, 10 g L⁻¹ yeast extract, 182 g L⁻¹ sorbitol, 20 g L⁻¹ glucose) media with 50 mg/L⁻¹ of zeocin as a selection marker at 28 °C for 96 h. The integration of the inulinase gene into *K. pastoris* X33 was confirmed by colony PCR using the primers described above.

2.5. INU-ISO3 site-directed mutagenesis

As a result of molecular dynamics, those amino acids from the catalytic pocket that presented a significant change in binding energy were chosen as candidates to carry out site-directed mutagenesis. Trp79, Phe113, Thr235, Gln236, and Gln339 were mutated by alanine using specific primers (Table 1).

The pPICZ α B-INU-ISO3 plasmid was used as a template to generate all mutants of Inu-ISO3 analyzed in this work. The modified protocol QuickChange was used to construct the different mutants [27]. The amplification of the plasmid was performed using a high-fidelity polymerase (Jena Bioscience, Germany).

The PCR products were purified and used to transform *E. coli* DH5 α by heat shock, and transformants were selected on LB solid media with zeocin (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Some colonies were selected and cultivated in liquid LB medium with zeocin (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) at 37 $^{\circ}\text{C}$ overnight. Finally, the plasmids were purified and sequenced to confirm the mutations.

2.6. Recombinant rInu-ISO3 purification and characterization

The positive transformants were used to express and purify the recombinant *exo*-inulinase (rInu-ISO3) and its mutants.

The strains were grown in 50 mL of BMGY (20 g L $^{-1}$ peptone, 10 g L $^{-1}$ yeast extract, 13.4 g L $^{-1}$ YNB, 10 g L $^{-1}$ glycerol, 100 mL of 100 mM pH 6.0 phosphate buffer for 1 L of medium) medium at 28 $^{\circ}\text{C}$, 200 rpm for 18 h. The cells were collected by centrifugation at 8000 rpm for 10 min and then transferred to 200 mL of BMMY (100 mM pH 6.0 phosphate buffer, 20 g L $^{-1}$ peptone, 10 g L $^{-1}$ yeast extract, 13.4 g L $^{-1}$ YNB, 0.4 mg L $^{-1}$ biotin, and 1 % methanol) medium. The culture grew until OD $_{600\text{nm}}$ was 1, and then the expression of the recombinant rInu-ISO3 and mutants was induced with 1 % methanol every 24 h over 96 h. At the end of induction, the medium was centrifuged at 9000 rpm for 10 min; the culture supernatant was harvested and concentrated by lyophilization.

The concentrated supernatant was restored with 5 mL of distilled water; then it was loaded into a 5-mL HisTrapTM HP column (Cytiva) pre-equilibrated with binding buffer (50 mM phosphate buffer, pH 7.2, 100 mM NaCl, 20 mM imidazole). The column was washed with five volumes of binding buffer and another five volumes of elution buffer (50 mM phosphate buffer, pH 7.2, 100 mM NaCl, 500 mM imidazole). SDS-PAGE analyzed the purified enzyme according to Laemmli 1970, and its molecular weight was determined by dynamic light scattering (DLS) and size exclusion chromatography (SEC). All samples were stored in phosphate buffer pH 7.2, 50 mM with 10 % glycerol at -70°C for later use.

2.6.1. Dynamic light scattering (DLS)

DLS estimated the molecular weight of the purified enzyme in its native form in a Zetasizer μV (Malvern) equipped with a photodiode laser (830 nm). The purified enzyme solution was filtered, and 500 μL (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was placed into the equipment cuvette and equilibrated at 25 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min. Ten measurements were collected for 30 s for each sample. The data were analyzed to obtain the hydrodynamic radius value. The reported value is the dominant peak's mean size, correlated with the molecular weight.

2.6.2. Size-exclusion chromatography (SEC)

An SEC Sephadex G-200 column (1 \times 40 GE Healthcare, USA) was used to corroborate the molecular weight of rInu-ISO3. The column was calibrated with a kit of gel filtration standards (Bio-Rad, USA) that contains a lyophilized mixture of molecular weight markers ranging from 1.35 to 670 kDa. The distribution coefficient, K $_d$, was determined for each marker and related to the molecular weight to obtain a standard curve and calculate the molecular weight of the enzyme.

2.7. Enzymatic assay

The exoinulinase activity of rInu-ISO3 and its mutants was performed in 50 mM acetate buffer, pH 5.5, using 1 % of inulin as substrate and 50 μ L of enzyme in a total volume of 1 mL. The reaction was incubated at 50 $^{\circ}$ C, 500 rpm for 15 min. The concentration of reducing sugars, the product of the inulin hydrolysis, was detected by the 3,5-dinitro salicylic acid (DNS) method and quantified by HPLC. As a result, one inulinase unit (U) was defined as the amount of enzyme that produces one μ mol of fructose (reducing sugar) per minute at 50 $^{\circ}$ C and pH 5.5.

The kinetic parameters, k_{cat} , K_m , and V_{max} of rInu-ISO3 and mutants were determined by assaying the enzyme's activity toward agavin, chicory inulin, and sucrose. Reactions were carried out in the best activity condition for each substrate. Nonlinear regression analysis was applied to estimate the kinetic parameters by least-squares regression in GraphPad Prism 8.

2.8. Carbohydrate determination

Reducing sugar production was measured once the reaction had been stopped; 100 μ L of the sample was mixed with 0.6 mL of DNS solution, incubated in a boiling water bath for 5 min, and then cooled in ice bath. Then, 4 mL of distilled water was added to the solution, and the absorbivity of the samples was measured at 540 nm in a Genesys 10S UV spectrophotometer, a method adapted from Ghose [28].

Fructose and glucose were analyzed using HPLC equipment with a light scattering detector (HPLC-PR-ELSD). A Unison UK-amino column (3 μ m, 250 \times 4 mm; Imtakt, USA) was used for the separation and quantification of fructose and glucose. A mobile phase of acetonitrile: water 85:15 at a flow rate of 0.2 mL min^{-1} for 30 min was used for elution. The analysis proceeded at 40 $^{\circ}$ C in the HPLC column. The conditions in the detector were 100 $^{\circ}$ C in the evaporator and 70 $^{\circ}$ C in the nebulizer. The nitrogen flow rate was 1 mL min^{-1} .

3. Results and discussion

3.1. Cloning, expression, and purification of rInu-ISO3

The INU gene was cloned into the pPICZ α B vector. This construction contains an α -factor signal peptide sequence from *Saccharomyces cerevisiae*, allowing the enzyme to be expressed as a secretory form in

K. pastoris X33. The inulinase was induced with methanol for 96 h and tested by the inulinase activity assay.

The activity of the recombinant inulinase in the culture supernatant was 70.5 U/mL after 96 h of the induction; after this time, the maximum activity was observed (Fig. 2). This value was higher than those reported in the supernatants of *Nocardioopsis sp.* (25.1 U/mL), *Kluyveromyces cicerisporus* (60 U/mL), and *K. marxianus* ISO3 (17.8 U/mL) [12,28,29]. However, the activity of rInu-ISO3 is similar to that expressed in *Yarrowia lipolytica* Po1h (73.1 \pm 2.4 U/mL) [29].

A 73 kDa protein band was observed by SDS-PAGE in the culture supernatant of the *K. pastoris* X-33 transformed with the pPICZ α B-INU plasmid. The activity in the supernatant and the presence of a protein band with a molecular weight close to the expected 63 (kDa) confirmed that the rInu-ISO3 was successfully expressed. The difference between the molecular weight of the expressed and the predicted protein was 10.6 kDa. This may be due to post-translational glycosylation of the enzyme; it is well known that inulinases, as many other secreted proteins from yeast, present *N*-glycosylations [12,30,31].

rInu-ISO3 and its mutants were purified by Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC), and the protein purity was analyzed by SDS-PAGE. A single wideband was observed with a molecular weight near 70 kDa (Fig. 3).

This protein is known to be a homodimer. It was analyzed by SEC in a calibrated Superdex 200 column to determine its molecular weight. The molecular weight of rInu-ISO3 was 259 kDa, similar to that obtained for the wild type, 256 kDa [12].

Also, the molecular weight of the enzyme was determined by DLS analysis. It shows a mono-disperse peak with a diameter of 11.5 \pm 0.1 nm (data not shown), corresponding to a molecular weight of 260 kDa. This value is similar to the wild-type enzymes, which were 11.3 [12] and 12.2 nm [32].

The differences between the observed size by SEC and DLS may come from the shape and glycosylation of the enzyme since wild-type inulinase is known to be glycosylated, and the glycosylation pattern in *K. pastoris* X-33 could be different.

The protein concentration at the end of purification was 54.1 mg/L $^{-1}$ of the culture medium; this result is almost twice compared to 28.6 mg/L $^{-1}$ obtained for another recombinant inulinase of *K. marxianus* expressed in *K. pastoris* [33].

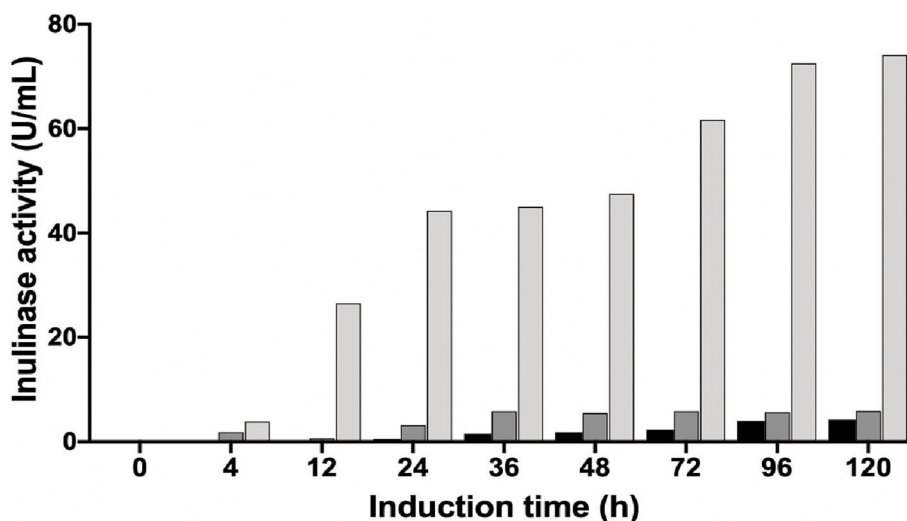


Fig. 2. Enzyme activity in the culture supernatant of *K. pastoris* at different times of the yeast growth. The enzyme expression was induced with 1 % of methanol every 24 h. Black bar, non-transformant cells; dark gray bar, cells transformed with pPICZ α B vector; clear gray bar, cells transformed with pPICZ α B-INU vector.

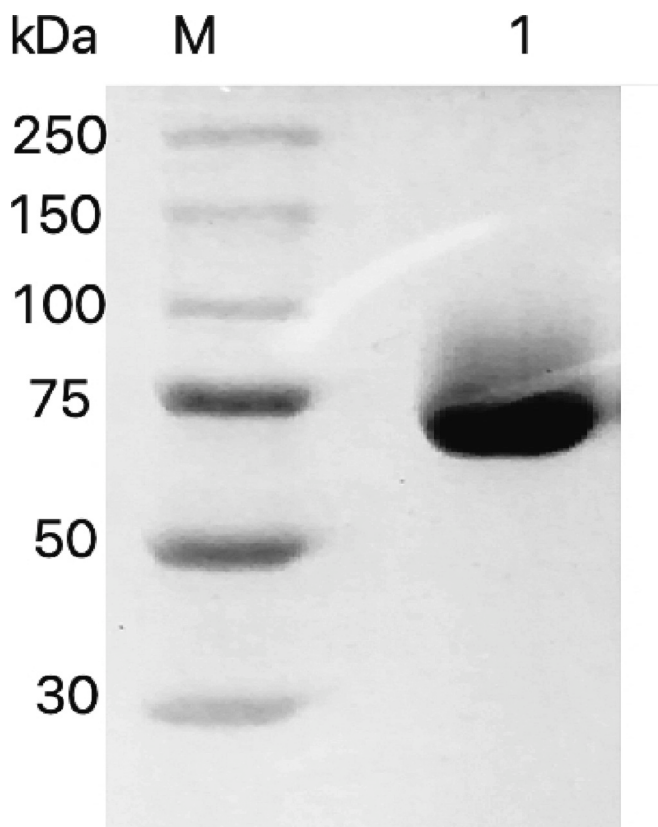


Fig. 3. Recombinant inulinase ISO3 SDS-PAGE analysis. Lane M, molecular weight marker; lane 1; inulinase purified by IMAC. Lane 1 was loaded with approximately 2.5 μ g of protein.

3.2. Characterization of rInu-ISO3

3.2.1. Effect of temperature and pH on the enzyme activity

Pure rInu-ISO3 was used to determine the effect of pH and temperature on enzyme activity. The hydrolytic activity was investigated over a wide range of temperature and pH values, from 25 to 70 $^{\circ}$ C and 2.5 to 7, respectively.

rInu-ISO3 displayed activity along the temperature range assayed and showed the best activity, 1470 U/mg, with chicory inulin at 50 $^{\circ}$ C and pH 4.5 (Fig. 4A), which was similar to the wild-type enzyme.

Although the activity for agavin and sucrose is lower than with chicory inulin (1017 and 183 U/mg, respectively), the best reaction conditions were also 50 $^{\circ}$ C and pH 4.5 (Fig. 4B and C). The difference in activity between fructans implies that the branches in the substrate have a significant impact on rInu-ISO3 hydrolysis efficiency. Temperature and pH results agree with the best activity conditions reported for the inulinases of *K. marxianus* NRRL Y-7571 [34].

Only two apparent differences were noticed between rInu-ISO3 and Inu-ISO3 catalysis. The first was a 10 $^{\circ}$ C reduction in the temperature for sucrose hydrolysis by the rInu-ISO3; the second was the reduction in one unit of the pH for agavin hydrolysis, from 5.5 for the wild type to 4.5 for the recombinant enzyme.

3.2.2. Determination of the kinetic parameters of rInu-ISO3

The best pH and temperature conditions for each substrate were used to perform the initial rate vs. substrate concentration curves to determine the kinetic parameters by fitting data to the Michaelis-Menten equation.

When the values of parameters were compared with those obtained to Inu-ISO3, all showed subtle changes (Table 2). In rInu-ISO3, the K_m for chicory inulin was reduced from 3.9 to 2.4 mM; the same effect was

observed for the k_{cat} value in the recombinant enzyme, showing an increase of 18 %. Thus, the catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) for this substrate was modified almost twice.

A similar case was observed with agavin, where the catalytic efficiency was increased onefold in rInu-ISO3. These changes do not have a clear origin because the protein had the same amino acid sequence and similar behavior. A possible explanation is the difference in the glycosylation pattern between *K. pastoris* and *K. marxianus*. In the β -fructofuranosidase from *Rhodotorula dairenensis*, a member of family GH32, modifications in the enzyme glycosylation were found, which reorient some parts of the protein structure when the expression system is changed [35]. Differences in glycosylation between rInu-ISO3 and the WT enzyme could be redesigning the protein and changing its enzyme activities, like in the β -fructofuranosidase from *R. dairenensis*.

Sing, and Arrizon reported K_m values of 3.4 and 7.2 mM, respectively, for chicory inulin [10,36]. These values are similar to those obtained for rInu-ISO3 (2.4 mM).

On the other hand, different values of K_m for sucrose were reported from 15.7 to 40.2 mM [10,37,38]. In this work, a K_m of 93.0 mM was obtained, twice the value reported by Cruz-Guerrero.

Regarding the k_{cat} , few works report this value; the only value previously reported for an inulinase from *K. marxianus* was from Arrizon's group. The k_{cat} values for chicory inulin were 0.70 s^{-1} , 11.7 s^{-1} for agavin, and 37 s^{-1} for sucrose; in this work, k_{cat} were 1636.0, 1345.0, and 845.0 s^{-1} for the same substrates. Although the k_{cat} for rInu-ISO3 is lower than that for fungal inulinases, such as that from *A. niger* 12, its k_{cat} is higher than that of bacterial enzymes and even higher than those produced by other *K. marxianus* strains [39]. This constant represents an excellent parameter for studying the relationship between the enzyme and its substrates.

3.3. Bioinformatic analysis

A combination of informatics analysis was necessary to select those amino acids probably implicated in the inulinase-substrate binding. First, the structure of the inulinase from *K. marxianus* DMKU3-1042 (PDB 6J0T) was used to build the complexes with substrates. Then, molecular dynamics of the complexes were performed with GROMACS by 100 ns to calculate the RMSD of the complex and the protein alone and the minimal distance between the inulinase and substrate, observing the stability of the protein since 5 ns (Supplementary material). Finally, the binding energy for each amino acid was calculated using the MMPBSA tool proposed by the group of Kumari [26].

Experimental data shows that Inu-ISO3 hydrolyzes different substrates such as agavin, chicory inulin, and sucrose. Based on this information, three complexes of Inu-ISO3 with inulin, levan, and agavin were constructed, each one with six units of fructose. The MD results showed interactions with chicory inulin and agavin in positions 1, 1, and 2 (Fig. 5). These results are in agreement with experimental kinetic data (Table 2), as the enzyme displayed the highest affinity for inulin and agavin.

Focusing on the contribution of different amino acid residues in the substrate binding by MD, a favored stacking-like interaction was observed with Trp79, and with Phe113 (Fig. 5B and C), while residues Gln236 and Gln 339 are proposed to form hydrogen bonds with positions 1, 1, and 2 of the inulin chain (Fig. 5D and E). Changes in these amino acids could impact the binding of substrates. In addition, the higher binding energy contribution was attributed to Trp79 with

24.8 kJ/mol (Table 3). The position and interaction of this residue may be relevant for the correct substrate orientation.

Analyzing and comparing the positions of the aromatic amino acids in the enzyme with other complexes reported, it was observed that they are part of a hydrophobic patch in the active site. These positions and the hydrophobic patch definition were previously reported in the β -fructofuranosidase of *Schwanniomyces occidentalis*, which also belongs to the GH32 family [19]. Although this protein only has 45.7 % identity with

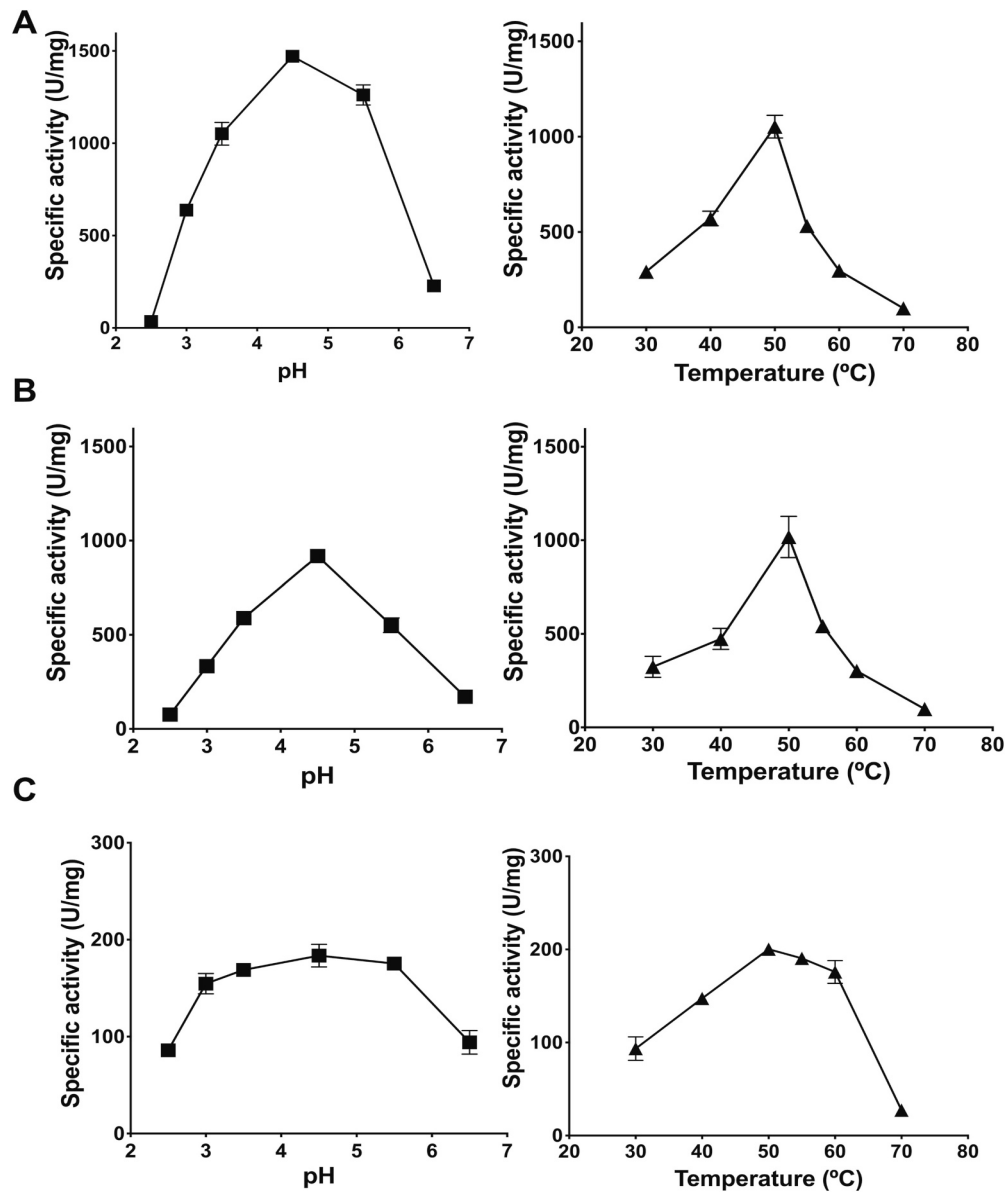


Fig. 4. Effect of temperature and pH on rInu-ISO3 activity using as substrates A) chicory inulin, B) agavin, and C) sucrose. The reaction was carried out for 10 min with 1 % of substrate (w/v) in phosphate buffer 50 mM (pH > 5.5) or acetate buffer 50 mM (pH < 5).

Table 2
Comparison of kinetic parameters between rInu-ISO3 and the wild-type enzyme.

Substrate	Wild type Inu-ISO3			Recombinant Inu-ISO3 (rInu-ISO3)		
	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m
Chicory inulin	3.9 ± 1.2	1380 ± 45.4	351 ± 17.6	2.4 ± 0.5	1636 ± 3.9	684 ± 34.2

interacted with the three substrates but with different energy; in the three cases of the fructan-inulinase complex, the sum of the hydrophobic patch binding energy showed a value between 37.2 to 46.8 kJ/mol, while the complex with sucrose only amounted to 29.8 kJ/mol. This binding energy value may indicate that this region is more critical in stabilizing polymeric substrates than sucrose. A comparison of the binding energies between the sucrose-enzyme and fructan-enzyme complexes revealed a decrease of 63 % of the energy concerning the fructan-enzyme complex

when	the	mutant	Trp79:				
Agavin	11.8 ±	339 ±	28.8 ±	4.1 ±	1345 ±	328 ±	
Sucrose	1.7	97.3 ±	5.7	1.4	0.4	1.3	16.4
	17.8	17.8	414 ±	4.2 ±	93 ±	845 ±	9.1 ±
			5.0	0.2	16.2	1.4	0.5

Ala was analyzed with the same conditions as the other residues. Ala did not undergo significant changes (Table 3 and Fig. 5B-C).

Analyzing other complexes in the Protein Data Bank, like the fructan 1-exohydrolase from *C. intybus* (2ADD), the β-fructofuranosidase from

Inu-ISO3, residues Trp76, Phe110, and Trp314 are equivalent to Trp79, Phe113, and Trp335 in Inu-ISO3, and are part of the hydrophobic patch in the active site in the enzyme (Fig. 6). Likewise, these residues

Thermatoga maritima (1UYP), and the *endo*-inulinase from *Aspergillus ficuum* (3RWK), the presence of Trp79 and Phe113 in the most cases are conserved in the family GH32, implying a possible crucial role in

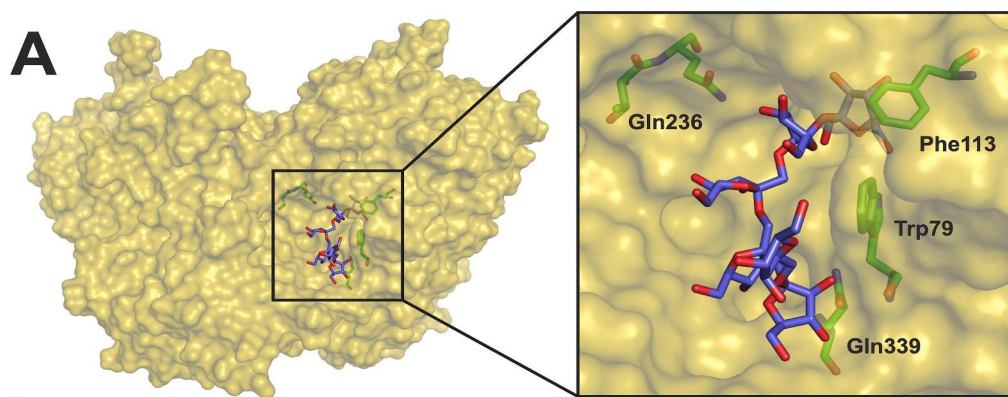


Fig. 5. Interactions of Inu-ISO3 with chicory inulin after ten ns of MD. A) Close-up view of the six units of inulin (blue) in the catalytic cavity of the inulinase surrounded by amino acids (green) with higher free binding energy. B) Interactions of Trp79 with -1 and +1 positions of inulin. C) Interaction of Phe113 with the fructosyl extreme of inulin in position -1. D) Hydrogen bond between ring in position +1 with Gln236. E) Interaction between position 2+ and Gln339 through hydrogen bonding. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

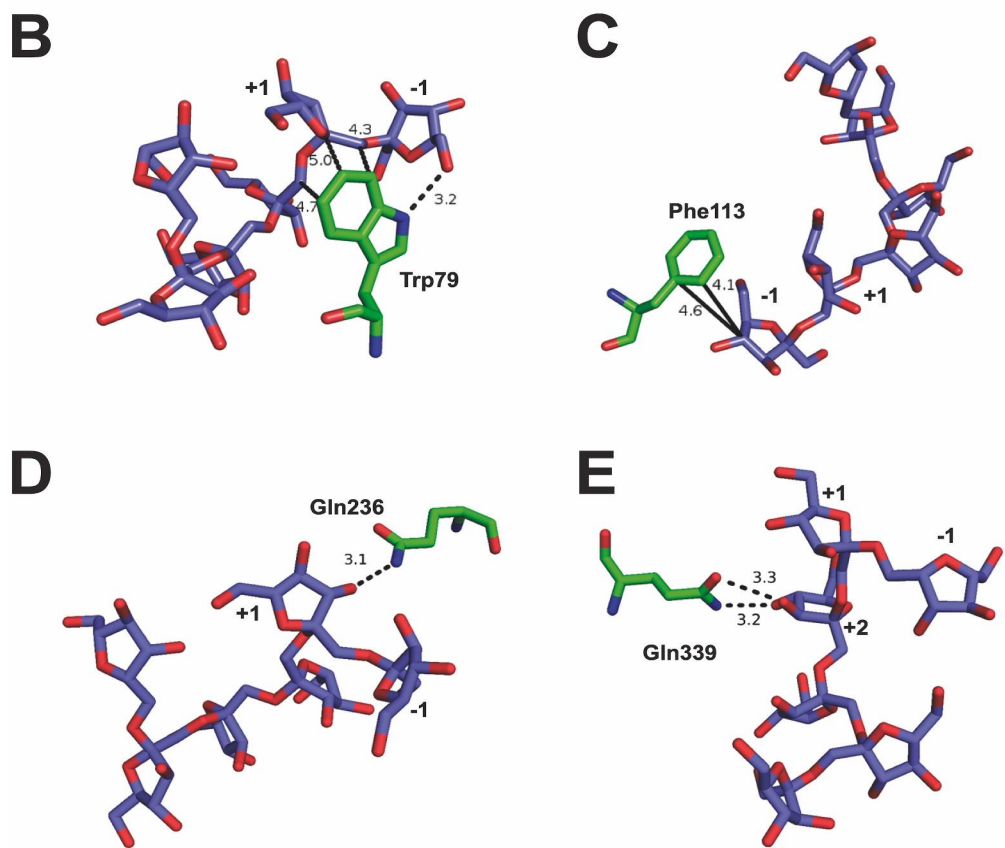


Table 3
Free energy contributions of the main amino acids involved in substrate binding at the active site of Inu-ISO3.

Residue	Complex		
	Agavin-E (kJ/mol)	Chicory inulin-E (kJ/mol)	
Trp79	-26.9 ± 3.2	-22.2 ± 1.7	-9.0 ± 1.0
Phe113	-11.6 ± 0.9	-11.7 ± 0.9	-3.6 ± 0.1
Ser114	-5.4 ± 1.2	0.1 ± 0.1	-4.9 ± 0.1
Asp181	-4.0 ± 1.9	1.0 ± 0.2	2.4 ± 0.50
Gln236	-1.8 ± 0.08	-0.3 ± 0.05	0.02 ± 0.01
Trp335	-11.1 ± 2.5	-12.3 ± 1.7	-10.0 ± 0.8
Gln339	-2.9 ± 0.3	-0.07 ± 0.01	-0.05 ± 0.01

binding and/or substrate orientation, in agreement with previous reports [17].

On the other hand, Glutamine 236 and 339 interact *via* H-bonds with the substrate in different positions; Gln236 with 1 and Gln339 with 2 position of the fructan (Fig. 5D and E). To compare these positions in Inu-ISO3 with other inulinases, a superposition with structures of the β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* (3PIJ) and the *exo*-

inulinase from *Aspergillus awamori* (1Y9G) was done, in this position, 236, there was methionine and valine respectively.

Gln236 is also conserved in position 228 in the β -fructofuranosidase from *Schwanniomyces occidentalis*. It interacts with the third fructose unit of inulin [19], while Gln236 of Inu-ISO3, according to the MD results, participate in H-bonding with the second fructose residue of inulin.

In the case of Gln339, the superposition of the inulinase from

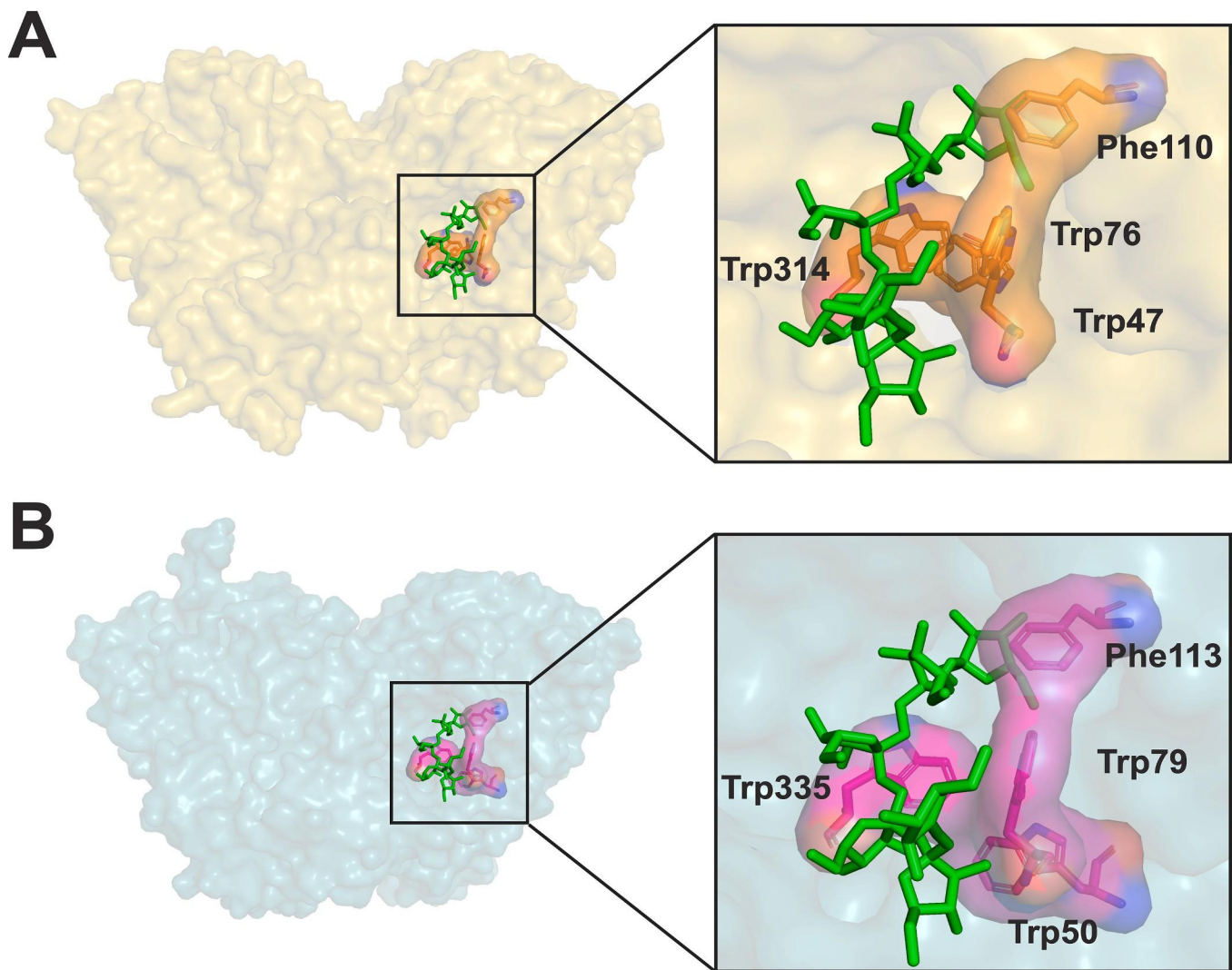


Fig. 6. Hydrophobic patch in two different enzymes of family 32 in the catalytic domain. A. hydrophobic patch (red) in the complex of β -fructofuranosidase (gold) from *Schwanniomyces occidentalis* with inulin (green), B. hydrophobic patch (orange) in the complex of *exo*-inulinase (blue) from *K. marxianus* ISO3 with inulin (green). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

K. marxianus with the invertase from *S. cerevisiae* (4EQV), the endo inulinase from *A. ficcum* (3RWK), and the invertase of *T. maritima* (1UYP) shown that in this position the residues found were Ala, Ser, and Glu, respectively.

Regarding these superpositions, it could be assumed that the presence of polar residues like Glu or aliphatic like Ala or Ser in these positions and their interaction with the substrate could be responsible for the different substrate specificity in the family GH32.

Considering the results obtained by MD and the comparison with similar complexes in the literature, Trp79, Phe113, Gln236, and Gln339

ence of polar residues like Glu or aliphatic like Ala or Ser in these positions and their interaction with the substrate could be responsible for

have the maximum binding energy contributions and therefore their role in ligand binding was investigated by *in-silico* mutagenesis and MD (Fig. 5, Table 4). The *in-silico* mutation Trp79:Ala

reduces the energy binding to Phe113 Gln236

Table 4

Free energy contributions of the mutated amino acids involved in substrate binding at the active site of Inu-ISO3.

Residue	Chichory inulin-E (kJ/mol)		Sucrose-E (kJ/mol)		
	Wild type	Mutant	Wild type	Mutant	Wild type
Trp79	-24.8	-3.8 ±	-24.1	-4.4 ±	-9.6
	± 5.7	0.20	± 0.9	± 2.2 ±	0.20
	-9.5 ±	-3.0 ±	± 12.9	± 2.0	-1.7 ±
	2.4	0.10	1.0	± 2.2 ±	0.06
	0.7 ±	-0.07 ±			-1.2 ±
		0.01			0.01 ±

± 1.2
 -9.4
 ± 1.9
 $0.4 \pm$

0.2
 $-4.7 \pm$
0.2
 $0.5 \pm$
0.1

inulin, sucrose, and agavin by about 80 % (Table 4). This change could be a determinant in the binding of the substrate.

However, it seems that the structure of the carbohydrates is not indispensable for recognition

since the reduction in the energy value follows the same tendency in all substrates analyzed. Also, this mutation could affect residues such as Phe113 and Gln339 because, according to the MD, it generates new interactions with position -1 and $+1$ of the agavin, respectively.

Gln339

$-4.7 \pm$
1.9

$-0.4 \pm$
0.03

$-0.1 \pm$
0.04

$-0.7 \pm$
0.07

$0.1 \pm$
0.01

$0.1 \pm$
0.01

The changes in the other residues also produced a decrease in the binding energy of substrates. Phe113:Ala mutation produced a mild negative effect in binding energy for all the substrates tested, while Gln236:Ala mutation has only minimal negative effects on the binding

energy of chicory inulin. Finally, mutation Gln339:Ala showed a tenfold reduction in the energy of binding only for agavin, and showed no noticeable effects on the binding energies of chicory inulin or sucrose (Table 4).

3.4. Catalytic properties of rInu-ISO3 mutants

Four Mutants were generated from the previous construction of the recombinant enzyme using the Xia protocol [27]. The experimental results showed that all mutations in rInu-ISO3 caused changes in the kinetic parameters (Table 5). A critical mutation was Trp79:Ala because the activity against inulin and agavin was lost, while against sucrose was only 2 % preserved. Therefore, it was impossible to get K_m and k_{cat} . To determine the kinetic parameters for sucrose, it was necessary to increase >200 times the amount of protein and the reaction incubation time. However, the catalytic efficiency was reduced from 9.1 to 0.1 $mM^{-1} s^{-1}$, which represents a 98 % loss. A similar behavior was reported by Ma et al. [40]; they mutated the same position to Leu in the inulinase from *K. cicerisporus*, and the activity toward inulin or sucrose was undetectable.

The enzyme inactivation can be inferred using the MD results since the mutation Trp79:Ala in the hydrophobic patch increased the size of the catalytic pocket, reducing the number of interactions that stabilize the enzyme-substrate complex and causing the observed lack of activity, probably as product of the poor entropy reduction of the substrate's conformational states, and a deficient geometrical arrangement of the substrate and the catalytic residues for catalysis (Fig. 7 A-B).

On the other hand, when positions 113 and 236 were mutated to Ala, K_m values increased, and k_{cat} values decreased almost one-fold for the hydrolysis of fructans, compared to rInu-ISO3 (Table 5). Once the hydrolysis of sucrose was analyzed, the K_m value decreased *circa* nine times, from 93.0 mM of rInu-ISO3 to 11.1 mM and 11.3 mM of Phe113: Ala and Gln236:Ala respectively. Indeed, this variation in K_m impacted the catalytic efficiency, increasing it approximately 4 and 5 times (Table 5), transforming these mutant enzymes into invertases at low substrate concentration (about 0,1 K_m), that is the condition for a fair comparative use of the k_{cat}/K_m parameter.

A similar situation was reported in the fructan 1-exohydrolase from *C. intybus*, the inhibition by sucrose was reduced, and its activity increased when the Trp82 was modified to Leu. The position of this residue is similar to the Phe113 in rInu-ISO3. Verhaest, in 2007, identified that Trp82 could orient the sucrose molecule [17], possibly generating a complex that inhibits the catalytic activity. Also, Le Roy, in 2007, reported that mutation Phe233:Asp increased the catalytic efficiency for sucrose in the levanase from *Beta vulgaris*. Additionally, they transformed the cell-wall invertase from *A. thaliana* into a fructan 1-exo-hydrolase by changing the residue Asp239 to Ala [17].

In another work, two mutations (Trp and Leu) in Phe113, the same position selected in this work, were carried out in the inulinase from *K. cicerisporus*. The first mutation Phe113:Trp provoked an increase of the K_m values for inulin and sucrose, of two- and threefold respectively. In contrast, the K_m value of rInu-ISO3 mutant Phe113:Ala for sucrose

decreased three times toward sucrose compared to the wild-type enzyme. The second mutant, Phe113:Leu, had no activity toward either inulin or sucrose in the inulinase from *K. cicerisporus* [40].

Furthermore, the mutant Gln339:Ala only showed a decrease of about four times in the catalytic efficiency against fructans, and no changes were observed with sucrose. The MD results suggest that these mutations reduce the binding energy, but the residues near the catalytic triad, like Asn273, decrease the distance of the hydrogen bond between the residue and position 2 of agavin, while the stacking interaction between Trp334 and the same position 2 of the substrate could be stronger compensating the missing interactions of Gln339 in the mutant (Fig. 8).

4. Conclusions

MD simulations between inulinase Inu-ISO3 from *K. marxianus* and its substrates found that mutations in some amino acids in the hydrophobic patch are relevant for the molecular recognition of their substrates. Such residues were Trp79 and Phe113, located at the entrance of the catalytic pocket, and, Thr235, Gln236, and Gln339, situated in the catalytic site but not in the conserved motifs.

To study the contribution of these specific residues to the function of Inu-ISO3, all residues were substituted with Ala, and the consequences of these substitutions were evaluated relative to the energy binding of the wild-type enzyme. MD simulations data showed a decrease in the energy binding of the mutated residue of all the mutated enzymes. The most important effects were caused by the mutant Trp79:Ala, leading to an increase in size in the entrance cavity and the loss of the interaction within the position 1 and 1 of the fructans.

Cloning and expression of the Inu-ISO3 in *K. pastoris* showed that the recombinant enzyme, rInu-ISO3, is a good model of the wild-type enzyme, and also helped to construct the Ala-mutant enzymes *in vitro* to study their kinetic properties.

Due to the loss of direct interaction of Trp79 with the substrate, kinetic parameters data of the mutant Trp79:Ala showed that the catalytic performance of rInu-ISO3 was lost upon this change. Also, Phe113:Ala, which according to MD simulation loses the stacking interaction in the position 1 with fructans, shows a sensible ninefold decrease in the catalytic efficiency toward fructans, and an increase of the same parameter of about fourfold to sucrose, transforming this mutant enzyme in an invertase, given its substrate preference. In conclusion, our study suggests that positions 79 and 113 are key in substrate recognition and activity of inulinase ISO3 from *K. marxianus*, while polar residues Thr235, Gln236 and Gln339 also participate in substrate binding, although to a minor extent.

CRediT authorship contribution statement

C. Montiel: Project administration, Conceptualization, Writing- Reviewing, and Editing.

J. Trapala: Investigation, Methodology, Data curation, Writing- Original draft preparation.

Table 5
Kinetic parameters of the rInu-ISO3 mutants.

Enzyme	Inulin			Agavin			Sucrose		
	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($mM^{-1} s^{-1}$)	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($mM^{-1} s^{-1}$)	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($mM^{-1} s^{-1}$)
rInu-ISO3	2.4 ± 0.5	1636 ± 3.9	684 ± 34.2	4.1 ± 0.4	1345 ± 1.3	328 ± 16.4	93.0 ± 16.2	845 ± 1.4	9.1 ± 0.5
Trp79:Ala	ND	ND	ND	ND	ND	ND	71.7 ± 12.2	8.5 ± 0.1	0.1 ± 0.0
Phe113:Ala	26.3 ± 1.1	724 ± 25.0	27.6 ± 1.7	11.1 ± 2.9	415 ± 3.6	37.5 ± 3.4	11.1 ± 1.8	415 ± 9.2	37.5 ± 2.6
Thr235:Ala	11.4 ± 3.3	1894 ± 10.0	158 ± 8.0	6.6 ± 1.0	754 ± 16.0	114 ± 0.7	46.7 ± 6.1	321 ± 0.7	6.9 ± 0.6
Gln236:Ala	11.3 ± 2.7	605 ± 13.6	53.5 ± 2.8	36.9 ± 3.5	1339 ± 8.9	36.3 ± 1.8	11.3 ± 1.6	605 ± 13.7	53.5 ± 6.4
Gln339:Ala	8.5 ± 1.6	1484 ± 9.2	173 ± 4.6	7.1 ± 0.9	915 ± 15.0	128 ± 6.0	47.1 ± 2.5	492 ± 9.1	10.5 ± 1.3

ND, activity non-detected.

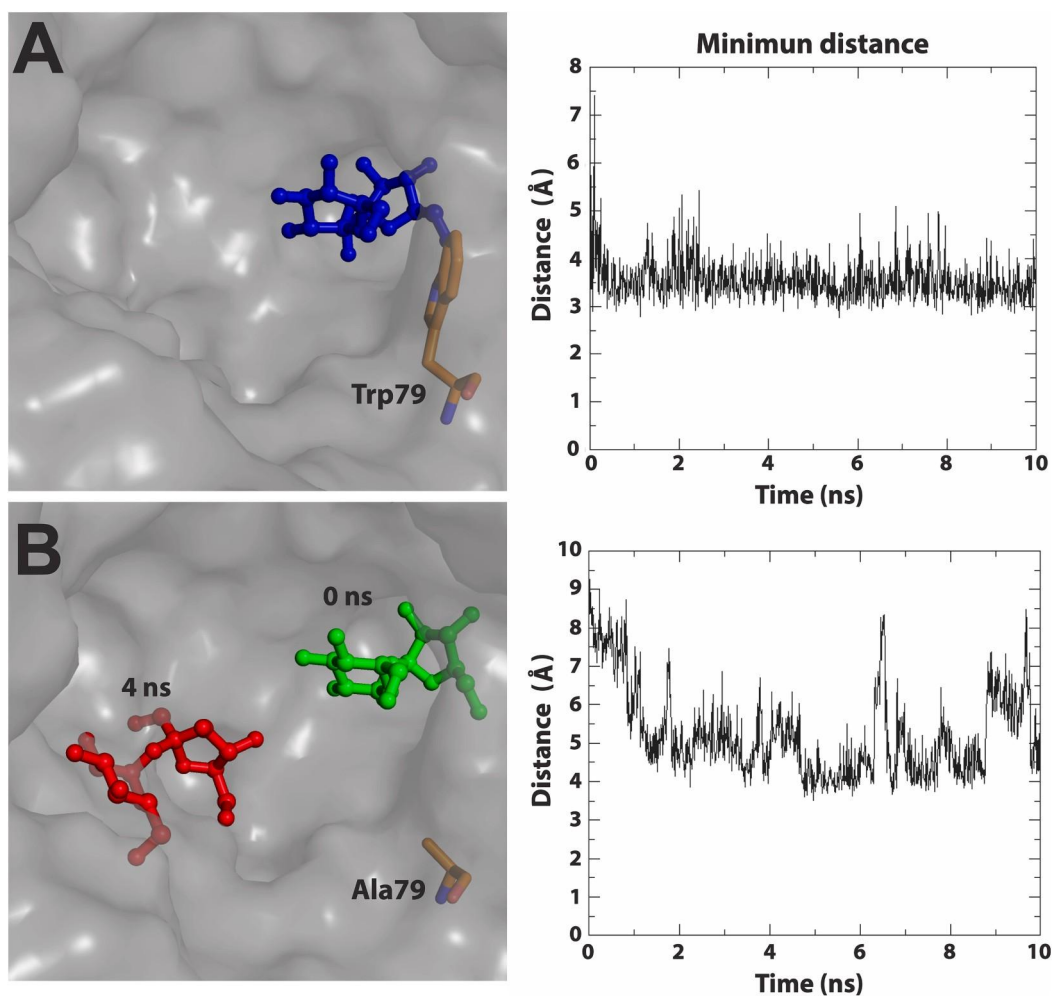


Fig. 7. Comparison of the catalytic pocket of the complex with sucrose between rInu-ISO3 and its mutant Trp79:Ala. A) rInu-ISO3 with sucrose (blue) in the catalytic cavity stabilized and minimum distance graph between Trp79 and sucrose at final temperature (365 K) by ten ns. B) Trp79Ala mutant with sucrose at the beginning of MD (time = 0) (green), sucrose after four ns (red), and minimum distance graph between alanine and carbohydrate. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

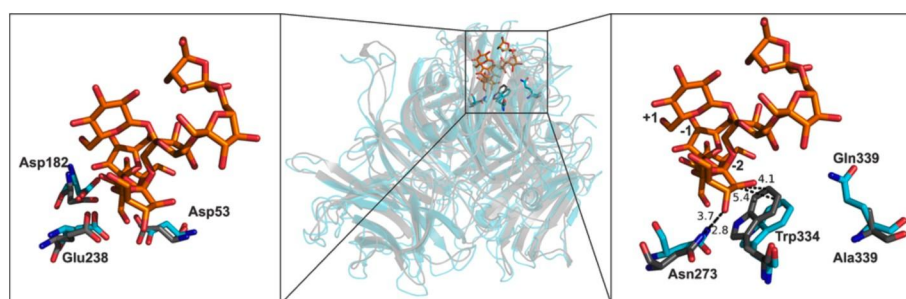


Fig. 8. Comparison of the mutant Gln339:Ala of rInu-ISO3 in complex with agavin. Left panel, arrangement of the catalytic residues in the wild-type (cyan) and the mutant Gln339:Ala (gray) enzymes. Right panel, interactions in position +2 between positions 273, 334, and 339 of the wild-type (cyan) and the mutant Gln339:Ala (gray) enzymes. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

M. González-Andrade: Methodology, Investigation, Data curation.
 C. Olvera: Visualization, Writing-Review, Editing.
 M. Cayetano-Cruz: Resource, Supervision.
 J. Sanz-Aparicio: Methodology, Writing-Review.
 E. Jiménez-Ortega: Writing-Review.
 I. Bustos Jaimes: Writing-Review, Editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This work was supported by DGAPA-UNAM (Grant PAPIIT IN219520). J. Trapala acknowledges financial support from CONACyT through a Ph.D scholarship.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124734>.

References

- [1] R. Singh, R. Singh, Production of fructooligosaccharides from inulin by endoinulinases and their prebiotic potential, *Food Technol. Biotechnol.* 48 (2010) 435–450.
- [2] T. Uhm, M. Chung, S. Lee, F. Gourronc, I. Housen, J. Kim, J. Van Beeumen, B. Haye, J. Vandenaute, Purification and characterization of *Aspergillus ficcum* endoinulinase, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63 (1999) 146–151.
- [3] K. Singh, P. Shukla, Molecular modeling and docking of microbial inulinases towards perceptible enzyme-substrate interactions, *Indian J. Microbiol.* 52 (2012) 373–380.
- [4] K. Kim, A. Nascimento, A. Golubev, I. Polikarpov, C. Kim, S. Kim, Catalytic mechanism of inulinase from *Arthrobacter* sp. S37, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371 (2008) 600–605.
- [5] J. Chekkerur, A. Samanta, A. Dhali, A. Purushottam, S. Roy, P. Maria, In silico evaluation and identification of fungi capable of producing endo-inulinase enzyme, *PLoS ONE* 13 (2018) 1–19.
- [6] Z. Chi, Z. Chi, T. Zhang, G. Liu, L. Yue, Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82 (2009) 211–220.
- [7] R. Nagem, A. Rojas, A. Golubev, O. Korneeva, E. Eneyskaya, A. Kulminkaya, K. Neustroev, Crystal structure of α -exo-inulinase from *Aspergillus awamori*: the enzyme fold and structural determinants of substrate recognition, *J. Mol. Biol.* 344 (2004) 471–480.
- [8] M. Shoaib, A. Shehzad, M. Omar, A. Rakha, H. Raza, H. Sharif, A. Shakeel, A. Ansari, S. Niazi, Inulin: properties, health benefits and food applications, *Carbohydr. Polym.* 147 (2016) 444–454.
- [9] I. Munˆoz-Guti´errez, M. Rodrıguez-Alegrıa, A. Lo´pez-Munguıa, Kinetic behaviour and specificity of b-fructosidases in the hydrolysis of plant and microbial fructans, *Process Biochem.* 44 (2009) 891–898.
- [10] J. Arrizon, S. Morel, A. Gschaedler, P. Monsan, Purification and substrate specificities of a fructanase from *Kluyveromyces marxianus* isolated from the fermentation process of mezcalt, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 3298–3303.
- [11] A. Huazano-Garcıa, M. Lo´pez, Enzymatic hydrolysis of agavins to generate branched fructooligosaccharides (a-FOS), *Appl. Biochem. Biotechnol.* 184 (2018) 25–34.
- [12] J. Trapala, I. Bustos-Jaimes, P. Manzanares, E. B´arzana, C. Montiel, Purification and characterization of an inulinase produced by a *Kluyveromyces marxianus* strain isolated from blue agave bagasse, *Protein Expr. Purif.* 176 (2020) 105718–105726.
- [13] A. Reddy, F. Maley, Studies on identifying the catalytic role of Glu-204 in the active site of yeast invertase, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 13953–13957.
- [14] F. Alberto, C. Bignon, G. Sulzenbacher, B. Henrissat, M. Czjzek, The three-dimensional structure of invertase (b-fructosidase) from *Thermotoga maritima* reveals a bimolecular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting glycosidases, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 18903–18910.
- [15] B. Coninck, K. Le Roy, I. Francis, S. Clerens, R. Vergauwen, A. Halliday, S. Smith, A. Van Laere, W. Van den Ende, Arabidopsis AtcwINV3 and 6 are not invertases but are fructan exohydrolases (FEHs) with different substrate specificities, *Plant Cell Environ.* 28 (2004) 432–443.
- [16] S. Cimini, L. Di Paola, A. Giuliani, A. Ridolfi, L. De Gara, GH32 family activity: a topological approach through protein contact networks, *Plant Mol. Biol.* 92 (2016) 401–410.
- [17] K. Le Roy, W. Lammens, M. Verhaest, B. De Coninck, A. Rabijns, A. Van Laere, W. Van den Ende, Unraveling the difference between invertase and fructan exohydrolases: a single amino acid (Asp-239) substitution transforms Arabidopsis cell wall invertase 1 into a fructan 1-exohydrolase, *Plant Physiol.* 145 (2007) 616–625.
- [18] M. Verhaest, W. Lammens, K. Le Roy, C. De Ranter, A. Van Laere, A. Rabijns, W. Van den Ende, Insights into the fine architecture of the active site of chicory fructan 1-exohydrolase: 1-kestose as substrate vs sucrose as inhibitor, *New Phytol.* 174 (2007) 90–100.
- [19] M. ´Alvaro-Benito, A. Sainz-Polo, D. Gonz´alez-P´erez, F. Plou, B. Gonz´alez, M. Fern´andez-Lobato, J. Sanz-Aparicio, Structural and kinetic insights reveal that the amino acid pair Gln-228/Asn-254 modulates the transfructosylating specificity of Schwanniomycetes occidentalis β -fructofuranosidase, an enzyme that produces prebiotics, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 19674–19686.
- [20] D. van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A.E. Mark, H. Berendsen, GROMACS: fast, flexible and free, *J. Comput. Chem.* 26 (2005) 1701–1718.
- [21] Bevan Lab, GROMACS tutorial protein-ligand complex, Available online at, http://www.bevanlab.biochem.vt.edu/Pages/Personal/justin/gmx_tutorials/complex/index.html.
- [22] A. da Silva, W. Vranken, ACPYPE - AnteChamber Python Parser interface, *BMC Res. Notes* 5 (2012) 1–8.
- [23] H. Berendsen, J. Postma, W. Van Gunsteren, A. DiNola, J. Haak, Molecular dynamics with coupling to an external bath, *J. Chem. Phys.* 81 (1984) 3684.
- [24] R. Martonak, A. Laio, M. Parrinello, Predicting crystal structures: the Parrinello-Rahman method revisited, *Physiol. Rev. Lett.* 90 (2003) 075503–075511.
- [25] N. Baker, D. Sept, S. Joseph, J. McCammon, Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98 (2001) 10037–10041.
- [26] R. Kumari, R. Kumar, Open source drug discovery consortium, A. Lynn, g_mmpbsa - A gromacs tool for high-throughput MM-PBSA calculations, *J. Chem. Inf. Model.* 54 (2014) 1951–1962.
- [27] Y. Xia, W. Chu, Q. Qi, L. Xun, New insights into the quickchange process guide the use of phusion DNA polymerase for site-directed mutagenesis, *Nucleic Acids Res.* 43 (2015), e12.
- [28] T.K. Ghose, Measurement of cellulase activities, *Pure Appl. Chem.* 59 (1987) 257–268.
- [29] J. Ma, H. Cao, H. Tan, X. Hu, W. Liu, Y. Du, H. Yin, Cloning, expression, characterization and mutagenesis of a thermostable exoinulinase from *Kluyveromyces cicerisporus*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 178 (2016) 144–158.
- [30] B. Yuan, N. Hu, J. Sun, S. Wang, F. Li, Purification and characterization of a novel extracellular inulinase from a new yeast species *Candida kutaonensis* sp. nov. KRF1T, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96 (2012) 1517–1526.
- [31] J. Ma, Q. Li, H. Tan, H. Jiang, K. Li, L. Zhang, Q. Shi, H. Yin, Unique N-glycosylation of a recombinant exo-inulinase from *Kluyveromyces cicerisporus* and its effect on enzymatic activity and thermostability, *J. Biol. Eng. (Q. J. 2019)* 1–14.
- [32] M. Holyavka, T. Kovaleva, M. Grechkina, I. Ostankova, V. Artyukhov, Inulinases from various producers: the features of their permolecular organization, *Appl. Biochem. Microbiol.* 50 (2014) 17–24.
- [33] S. Zhang, F. Yang, Q. Wang, Y. Hua, Z. Zhao, High level secretory expression and characterization of the recombinant *Kluyveromyces marxianus* inulinase, *Process Biochem.* 47 (2012) 151–155.
- [34] M. Mazutti, A. Skrowonski, G. Boni, G. Zabot, M. Silva, D. de Oliveira, M. Di Luccio, M. Filho, M. Rodrigues, H. Treichel, Partial characterization of inulinases obtained by submerged and solid-state fermentation using agroindustrial residues as substrates: a comparative study, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160 (2010) 682–693.
- [35] E. Jim´enez-Ortega, E. Narmontaite, B. Gonzalez-P´erez, F. Plou, M. Fern´andez-Lobato, J. Sanz-Aparicio, Insights into the structure of the highly glycosylated ffase from *Rhodotorula dairenensis* enhance its biotechnological potential, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 14981–14998.
- [36] R. Singh, R. Dhaliwal, M. Puri, Partial purification and characterization of exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 for preparation of high fructose syrup, *J. Microbiol. Biotechnol.* 17 (2007) 733–738.
- [37] R. Rouwenhorst, L. Visser, A. van der Baan, A. Scheffers, J. van Dijken, Production, distribution and kinetic properties of inulinase in continuous of *Kluyveromyces marxianus*

- [CBS 6556, Appl. Environ. Microbiol. 54 \(1988\) 1131–1137.](#)
- [38] [A. Cruz-Guerrero, I. Garcia-Pen˜a, E. Barzana, M. Garcia-Garibay, L. Gomez-Ruiz, Kluyveromyces marxianus CDBB-L-278: a wild inulinase hyperproducing strain, J. Ferment. Bioeng. 80 \(1995\) 159–163.](#)
- [39] [M. Arjomand, M. Habibi-Rezaei, G. Ahmandian, M. Hassanzadeth, A. Karkhane, M. Asadifar, M. Amanlou, Deletion of loop fragment adjacent to active site diminishes the stability and activity of exo-inulinase, Int.J. Biol. Macromol. 92 \(2016\) 1234–1241.](#)
- [40] [J. Ma, T. Li, H. Tan, W. Liu, H. Yin, The important roles played in substrate binding of aromatic amino acids in exo-inulinase from Kluyveromyces cicerisporus CBS 4857, Front. Mol. Biosci. 7 \(2020\) 1–9.](#)