



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Transglicosilación enzimática de la sacarosa por medio de diversos sustratos  
aceptores

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

César Iván González Hernández

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Carmina Montiel Pacheco  
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Marcela Ayala Aceves  
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dra. Amelia Farrés González Sarabia  
Facultad de Química, UNAM

Ciudad de México. Noviembre, 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



## Agradecimientos

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN214123) y al Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado (PAIP 5000-9153)

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnología (CONAHCYT) por la beca otorgada para mis estudios de maestría.

A los miembros mi comité tutor: Dra. Marcela Ayala Aceves, Dra. Amelia Farrés González Sarabia y Dra. Carmina Montiel Pacheco por su tiempo y acompañamiento en este proceso.

A los integrantes del H. Jurado por su tiempo y sus observaciones que me dieron para poder mejorar este trabajo de tesis.





## Índice

Agradecimientos.....	2
Índice .....	3
Índice de figuras .....	4
Índice de tablas.....	5
Resumen.....	6
Marco teórico.....	7
Prebióticos .....	7
Síntesis de fructooligosacáridos .....	9
Hidrólisis Química.....	10
Producción por vía enzimática .....	11
Producción de fructooligosacáridos por inulinasas .....	12
Glicosilhidrolasas.....	13
Inulinasas.....	15
Propiedades catalíticas de las inulinasas .....	17
Mezclas eutécticas .....	19
Hipótesis .....	24
Objetivos .....	24
Objetivo general.....	24
Objetivos específicos .....	24
Metodología.....	25
Resultados.....	32
Conclusiones.....	55
Perspectivas.....	56
Bibliografía.....	57





## Índice de figuras

<i>Figura. 1: Ejemplos de fructooligosacáridos. Estructuras químicas de a) Kestosa b) Nistosa c) fructofuranosil nistosa. ....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 2: Estructura química de A. Inulina de achicoria y B. inulina de agave. ....</i>	<i>11</i>
<i>Figura. 3: Esquema de reacción de hidrólisis y transfructosilación enzimática. ....</i>	<i>12</i>
<i>Figura. 4: Mecanismo de reacción de las Glicosidasas por retención modificado de (Lee, 2017)...</i>	<i>15</i>
<i>Figura. 5: Esquema de productos obtenidos por inulinasas a partir de la inulina (Fernandes, 2014). ....</i>	<i>16</i>
<i>Figura. 6: Representación de la estructura cristalográfica de la inulinasa INU2 proveniente de Aspergillus ficuum (Pouyez et al., 2012). ....</i>	<i>17</i>
<i>Figura. 7: Diagrama de fases de dos componentes en mezclas eutécticas adaptado de (Pena-Pereira &amp; De La Calle, 2019). ....</i>	<i>21</i>
<i>Figura. 8: Interacciones de puentes de hidrógeno entre la urea y el ion cloro del cloruro de colina (Wagle et al., 2016). ....</i>	<i>22</i>
<i>Fig. 9 Resumen de lo pasos llevados a cabo en el presente trabajo. ....</i>	<i>25</i>
<i>Figura. 10: Etapa I de experimentación, síntesis de DES y estabilidad de sustratos y enzima ..... 27</i>	<i>27</i>
<i>Figura. 11: Etapa II de experimentación, Seguimiento de reacción en TLC. ....</i>	<i>28</i>
<i>Figura. 12: Etapa III de experimentación, Separación, identificación y caracterización del producto. ....</i>	<i>30</i>
<i>Figura. 13: Gráfica del porcentaje de actividad con relación a las diferentes mezclas eutécticas. Reacciones de hidrólisis a 50 °C por 30 min en soluciones al 1% de sacarosa. PG: DES cloruro de colina – propilenglicol. G: DES cloruro de colina – Glicerol EG: DES cloruro de colina – Etilenglicol. En todos los casos con 30% de buffer. Ensayo llevado por triplicado.....</i>	<i>34</i>
<i>Figura. 14: Gráfica del porcentaje de actividad con relación a un aumento de porcentaje de agua. Reacciones de hidrólisis a 50 °C por 30 min en soluciones al 1% de sacarosa. Ensayo único sin reproducciones. ....</i>	<i>35</i>
<i>Figura. 15: Gráfica del porcentaje de actividad hidrolítica con relación al tiempo en un periodo de un mes. Reacciones de hidrólisis a 50 °C por 30 min en soluciones al 1% de sacarosa. Ensayo llevado por triplicado. ....</i>	<i>36</i>
<i>Figura. 16: TLC de controles. De izquierda a derecha: Sacarosa, fructosa, DES, ácido gálico, DES + sacarosa. Fase móvil butanol, metanol, agua, ácido acético en relación 3:2:0.7:0.3.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura. 17: TLC de controles. De izquierda a derecha: Cloruro de colina, glicerol y DES. ....</i>	<i>37</i>
<i>Figura. 18: TLC de la reacción en sistema buffer y DES de izquierda a derecha. Condiciones 10% de sacarosa, 30 min a 50°C. ....</i>	<i>38</i>
<i>Figura. 19: Gráfica de la actividad hidrolítica con relación al tiempo y al porcentaje de buffer en el sistema en un periodo de 3 días y los productos de reacción a los diferentes porcentajes de buffer en el sistema DES. Reacciones de hidrólisis a 50 °C por 30 min en soluciones al 1% de sacarosa. Reacción para la TLC a 50 °C por 30 min en soluciones al 10% de sacarosa. Ensayo llevado por triplicado. ....</i>	<i>39</i>
<i>Figura. 20: TLC de la reacción en sistema buffer y DES de izquierda y derecha variando la concentración de sacarosa como sustrato en la reacción. A 50°C y 30 min de reacción. ....</i>	<i>40</i>
<i>Figura. 21: Gráfica de la actividad hidrolítica con relación al tiempo y al porcentaje de buffer en un periodo de 30 horas a 50 °C y los productos de reacción en el sistema DES. Reacciones de hidrólisis a 50 °C por 30 min en soluciones al 1% de sacarosa. Reacción para la TLC a 50 °C por 30 min en soluciones al 10% de sacarosa. Ensayo llevado por triplicado. ....</i>	<i>41</i>
<i>Figura. 22: TLC de la reacción en sistema DES de izquierda a derecha: variación de la cantidad de enzima, variación del tiempo de reacción, variación de la temperatura. ....</i>	<i>42</i>
<i>Fig. 23 Gráfica de la actividad hidrolítica con relación al tiempo y al porcentaje de buffer en un periodo de 30 horas a 30 y 40 °C y los productos de reacción en el sistema DES. Reacciones de hidrólisis a</i>	





30 y 40 °C por 30 min en soluciones al 1% de sacarosa. Reacción para la TLC a 40 °C por 30 min en soluciones al 10% de sacarosa. Ensayo llevado por triplicado. .... 43

Figura. 24: Cromatograma obtenido de diferentes fracciones de una cromatografía preparativa I. glucosa, II. fructosa, III. sacarosa, IV. 1-kestosa, V. blastosa, VI. inulobiosa, VII. 6-kestosa, VIII. levanobiosa, IX. neokestosa, X. 1,6-nistosa, XI. 6-neo-nistosa, XII. Inulotriosa..... 45

Figura. 25: TLC de la reacción en cloruro de colina glicerol. De izquierda a derecha: Mezcla de reacción diluida 1:2. Reacción diluida 1:2. Mezcla de reacción diluida 1:5. Reacción diluida 1:5. .. 46

Figura. 26: TLC de la reacción con ácido gálico y sacarosa en cloruro de colina - glicerol. De izquierda a derecha: Control de la reacción, reacción a 30 minutos, reacción a 45 minutos y reacción a 60 minutos. Reveladas con luz UV y con FeCl<sub>3</sub>..... 47

Figura. 27: TLC de la reacción con ácido gálico - sacarosa y resveratrol – sacarosa en cloruro de colina - glicerol. De izquierda a derecha: Control de la reacción, reacción a 30 minutos, reacción a 45 minutos y reacción a 60 minutos. Reveladas con solución de orcinol..... 48

Figura. 28: TLC de la reacción con ácido gálico - sacarosa y resveratrol – sacarosa en cloruro de colina - glicerol. De izquierda a derecha: Reacción con 20 mg de ácido gálico, Reacción con 10 mg de ácido gálico, Reacción con 20 mg de resveratrol, Reacción con 10 mg de resveratrol. .... 48

Figura. 29: Gráfica del porcentaje de actividad hidrolítica de la enzima inulinasa en ChCl-G con 30% de agua a diferentes concentraciones de ácido gálico reacción a 50°C por 30 minutos. Experimento realizado por triplicado. .... 49

Figura. 30: A) TLC de la reacción sacarosa y diferentes alcoholes en cloruro de colina – glicerol. De izquierda a derecha: Reacción con 30% butanol, Reacción con 30% heptanol, Reacción con 30% octanol. B) de izquierda a derecha: Reacción en medio acuoso, Reacción con DES. .... 50

Figura. 31: Ejemplo del sistema montado en GROMACS para la dinámica molecular de la enzima en el medio eutéctico coluro de colina-glicerol con 30 % de agua. .... 51

Figura. 32: RMSD de la enzima en un lapso de 1000 ns obtenido por dinámica molecular en GROMACS. .... 52

Figura. 33: RMSF de la enzima por residuos en los diferentes sistemas eutéctico y acuoso..... 52

Figura. 34: Diferencia de los movimientos por residuo entre el sistema eutéctico menos el sistema acuoso en las 2 cadenas de la enzima. .... 53

Figura. 35: Número de contactos entre las cadenas de la enzima a lo largo de la trayectoria de 1000 ns corrida en GROMACS. Radio de giro de la proteína en los diferentes medios acuoso y eutéctico por 1000 ns..... 54

## Índice de tablas

Tabla 1: Fuentes naturales de fructooligosacáridos (Sangeetha et al., 2005). .... 9

Tabla 2. Reacciones enzimáticas en medios no convencionales..... 20

Tabla 3: Reacciones de transglucosilación llevados a cabo en medios eutécticos..... 23

Tabla 4: Mezclas eutécticas de bajo punto de fusión usadas..... 25

Tabla 5. Sacáridos encontrados en la mezcla de reacción. .... 44





## Resumen

En el campo de la biotecnología, la producción de prebióticos, como los oligosacáridos, por vía enzimática, ha dado productos de interés para las industrias como la alimentaria y la farmacéutica.

Se sabe que algunos compuestos de cadenas de azúcares presentes en plantas y otros organismos, por su estructura química, no son degradados en el estómago, este es el caso de los fructooligosacáridos (FOS) debido a esta propiedad dada por el tipo de enlace  $\beta$ -(2-1) y el tamaño (4-5 unidades de fructosa) pueden llegar al intestino grueso y a partes distales del intestino delgado, ayudando a la proliferación de grupos de bacterias benéficas para el organismo y trayendo consigo beneficios a la salud.

En el presente proyecto, se buscó la síntesis enzimática de fructooligosacáridos con propiedades prebióticas, esto a partir de la sacarosa como sustrato en la reacción y el uso de un medio no convencional. Se empleó una inulinasa comercial de origen fúngico como biocatalizador.

El medio de reacción usado fue una mezcla eutéctica de bajo punto de fusión (DES), por sus siglas en inglés, estas mezclas tienen la propiedad de ser biodegradables, manejarse a temperatura ambiente y mantener la actividad enzimática en muchos casos.

Por medio de la reacción enzimática, se obtuvo una mezcla de fructooligosacáridos de diferente tamaño de cadena, mejorando su producción con el uso de un medio no convencional reduciendo el agua en el medio, y, por ende, la hidrólisis, favoreciendo la formación de FOS a través de transfructosilación. De igual manera, se intentó la síntesis de glicósidos, con un aglicón fenólico o alquílico, en estos medios aprovechando su bajo porcentaje de agua.

Se determinó el tipo de oligosacáridos que se producen y las mejores condiciones de reacción en este medio.





## Marco teórico

### Prebióticos

El concepto de prebiótico en un principio se definió como un alimento no digerible que afecta beneficiosamente al hospedero por la estimulación selectiva del crecimiento o actividad de una o un limitado número de bacterias en el colon, mejorando potencialmente la salud del hospedero (Gibson & Roberfroid, 1995).

Esta definición se reformularía por los mismos autores 13 años después como un ingrediente fermentado selectivamente que permite cambios específicos, en la composición y/o actividad en la microbiota gastrointestinal que confiere beneficios.

Para fines de este trabajo, se puede simplificar el concepto a un oligosacárido, fructooligosacárido en nuestro caso, como un compuesto no digerible que ayuda a incrementar las bacterias benéficas presentes en el tracto gastrointestinal. En la figura 1 se puede observar la estructura de los fructooligosacáridos más comunes de cadena corta con enlace  $\beta$  (1-2) entre unidades.

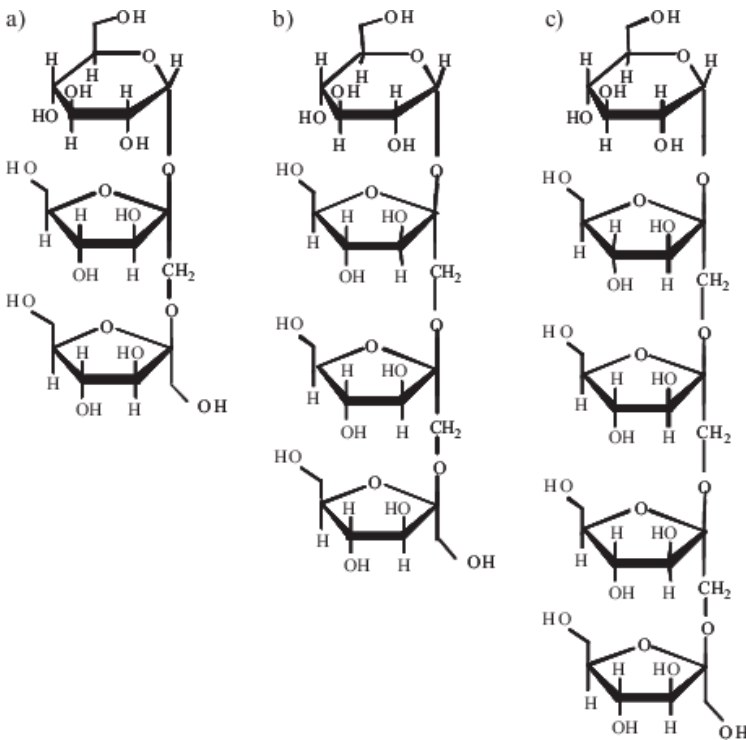


Figura. 1: Ejemplos de fructooligosacáridos. Estructuras químicas de a) Kestosa b) Nistosa c) fructofuranosil nistosa.







Para determinar si un compuesto es prebiótico, se deben de seguir ciertos criterios, según (Aguilera *et al.*, 2008; Niba *et al.*, 2009), son los siguientes:

1. Debe ser una sustancia no alterable, no hidrolizable, no digerida por las enzimas digestivas del tracto gastrointestinal alto (estómago e intestino delgado).
2. Debe ser un sustrato fermentable por un grupo o grupos de bacterias comensales del colon, por ejemplo, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*.
3. Su fermentación debe ser selectiva estimulando el crecimiento y/o la actividad de bacterias intestinales asociadas a efectos saludables para el anfitrión

Con esto se puede asegurar que los fructooligosacáridos cumplen cabalmente con la definición de prebióticos.

Por otro lado, otro uso que se les ha dado a los prebióticos como oligosacáridos es en la producción de animales para consumo humano como pollos o peces (Farzad *et al.*, 2021), donde se busca un mejor crecimiento y salud en los animales alimentados con un porcentaje de prebióticos en sus dietas.

En estos estudios se han reportado resultados favorables, por ejemplo, en el aumento de peso corporal y salud de truchas alimentadas con fructooligosacáridos (Ortiz *et al.*, 2013). Aunque aún se estudia toda la relación intrínseca entre prebióticos, probióticos, microbiota y el hospedero, es claro que se presenta una mejora en la salud al consumirlos. Estos compuestos son producidos de manera natural por diversas fuentes como se muestra en la tabla 1, sin embargo, la presencia de estos es en cantidades traza, lo que propicia que se busque su síntesis por otros medios (Mabel *et al.*, 2008).





Tabla 1: Fuentes naturales de fructooligosacáridos (Sangeetha *et al.*, 2005).

Fuentes de obtención	Porcentaje de fructooligosacáridos
Cebada	0.15
Tomate	0.15
Cebolla	0.23
Plátano	0.30
Azúcar morena	0.30
Centeno	0.50
Ajo	0.60
Miel	0.75

## Síntesis de fructooligosacáridos

Debido a la complejidad de la estructura del carbohidrato y a sus múltiples sitios de unión, la producción de FOS con alta pureza no es un proceso sencillo. En la naturaleza como se mencionó anteriormente, los FOS se encuentran en bajas concentraciones en diversos alimentos como la cebolla, el ajo, el plátano, la achicoria y en algunos cereales. Se produce en plantas por medio de repetidas transferencias de fructosa desde un donador vía enzimática, por ejemplo; las fructosiltransferasas (EC 2.4.1.99 y EC 2.4.1.100) las cuales transfieren un grupo fructosilo a la sacarosa y posteriormente elongan la cadena por subsecuentes transfructosilaciones (Flamm *et al.*, 2001). Por otro lado, estos compuestos se han logrado producir de manera sintética por dos procesos principales de hidrólisis de inulina y agavina, la química y la enzimática. La vía enzimática también ofrece la transfructosilación para la formación de FOS.





## Hidrólisis Química

La hidrólisis química de la inulina en condiciones de pH ácido es una forma simple de producir FOS. Este método ofrece las ventajas de ser un proceso sencillo, de bajo costo, con un tiempo corto de reacción (2 a 6 horas), en el cual se pueden emplear temperaturas mayores a 60 °C. Sin embargo, la reacción de hidrólisis puede generar subproductos no deseables, tales como el hidroximetilfurfural (HMF), el cual causa un color indeseado en el producto. A su vez, es necesario monitorear de forma constante los parámetros de reacción como la concentración del ácido, la temperatura y el tiempo para obtener el rendimiento y la productividad deseada en el proceso. Los rendimientos en la producción de FOS son bajos y la longitud de las cadenas obtenidas es variable (Vandamme & Derycke, 1983). Otro producto no deseable formado a pH bajo es el anhídrido de di-fructosa, que tiene un color característico y no tiene capacidad edulcorante.

Actualmente, el principal inconveniente en la producción de FOS mediante la hidrólisis química es la producción de furfural y las condiciones de reacción. Sin embargo, la hidrólisis ácida adquiere relevancia en la obtención de FOS a partir del agave, ya que la cantidad de fructanos acumulada en las plantas maduras [13-17% (p/p) peso fresco] es similar a la que se encuentra en la fuente actual de inulina, la achicoria [15.2-20.5% (m/m) peso fresco] (Martins *et al.*, 2019). La principal diferencia reside en la estructura de los polímeros de fructosa: mientras que en la inulina de achicoria las moléculas de fructosa se unen mediante enlaces  $\beta$  (2-1) en cadenas lineales, los fructanos presentes en el agave, especialmente en *Agave tequilana*, tienen un contenido relevante de enlaces  $\beta$  (2-6) que dan lugar a moléculas de fructosa ramificadas (fructanos tipo levano) en cadenas con grado de polimerización entre 3 y 29 estos enlaces (Figura 2).



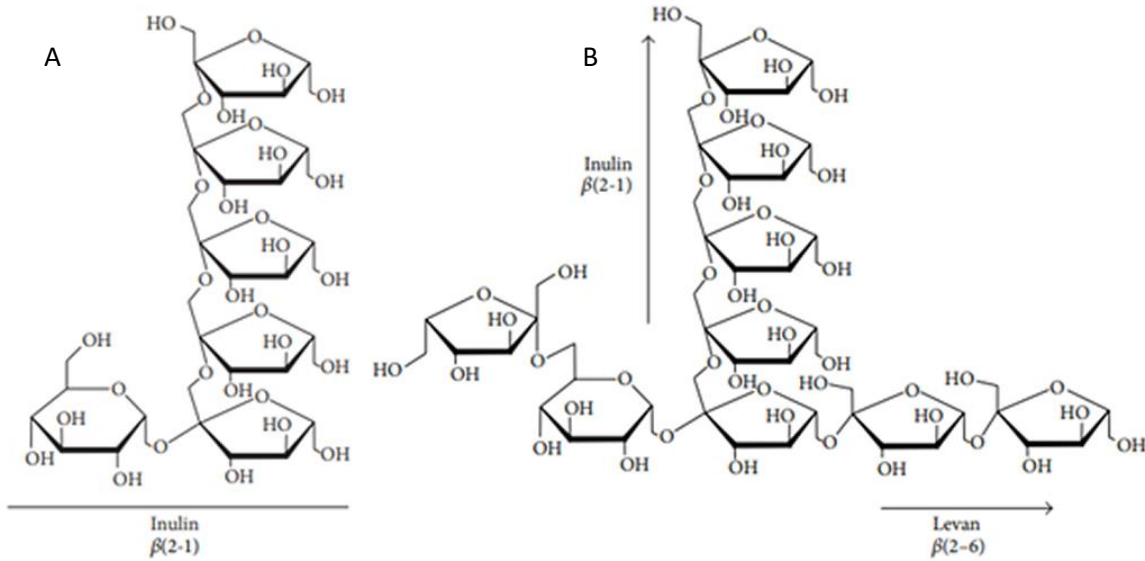


Figura 2: Estructura química de A. Inulina de achicoria y B. inulina de agave.

## Producción por vía enzimática

Los procesos enzimáticos resultan ser una forma alternativa para producir FOS ante la hidrólisis química, puesto que ofrecen como ventajas el sintetizarlos sin generar subproductos adicionales, empleando condiciones de reacción suaves en cuanto a temperatura y pH (temperaturas entre 30 y 60°C y pH entre 5 y 7). Existen enzimas utilizadas para la producción de FOS tales como las fructofuranosidasas, levanosacarasas o fructosil transferasas, las cuales se obtienen de diversas fuentes vegetales y microbianas (Nemukula *et al.*, 2009), estas enzimas forman FOS por hidrólisis o transfructosilación dependiendo el proceso.

Entre las enzimas utilizadas en el proceso de obtención de FOS, destacan las inulinasas, con las que se han realizado trabajos previos (Lira-León, 2021; Santos & Maugeri, 2007; Silva *et al.*, 2013) para determinar su capacidad para producir fructooligosacáridos a partir de sacarosa, ya que aunque es una hidrolasa presenta actividad transfructosilante.





## Producción de fructooligosacáridos por inulinasas

El uso de las inulinasas ha adquirido relevancia para llevar a cabo la reacción de transfructosilación dado que la enzima posee una actividad transfructosilante a altas concentraciones de sacarosa, por lo tanto, puede sintetizar fructooligosacáridos.

Además, la síntesis de fructooligosacáridos a través de la reacción de transfructosilación también se puede lograr mediante el uso de medios no convencionales que cambia el equilibrio de la reacción (Risso *et al.*, 2012). En la figura 3 se muestra un esquema de las vías de obtención de FOS abarcando la clásica hidrólisis enzimática e igualmente la transfructosilación de la sacarosa, destacando los oligosacáridos de bajo peso molecular que son más comunes en la obtención por vía transfructosilante.

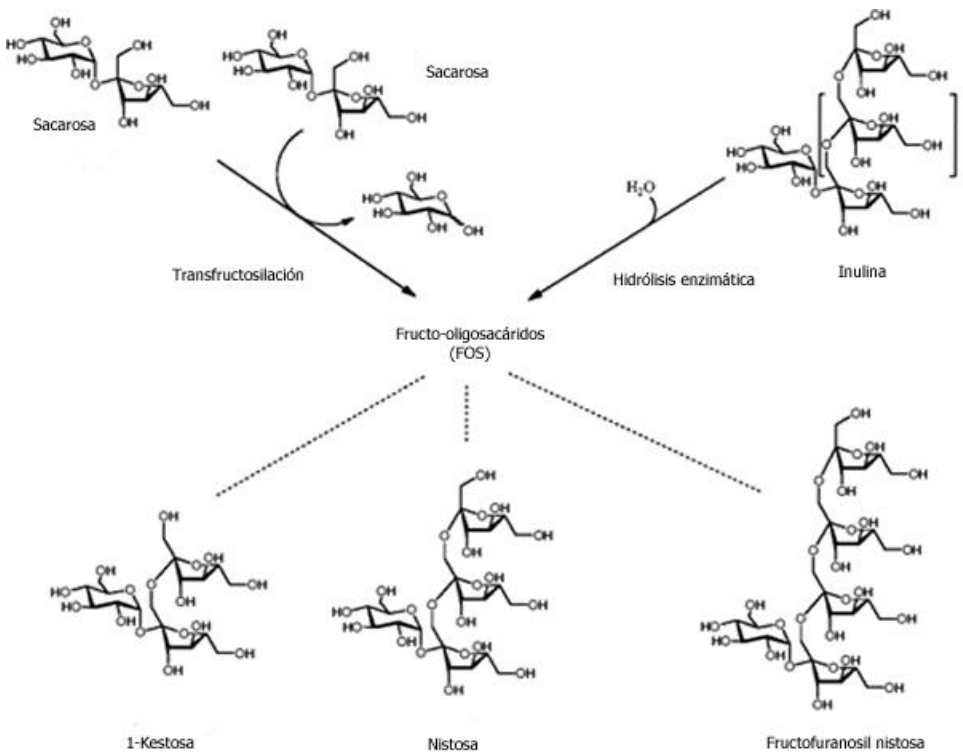


Figura. 3: Esquema de reacción de hidrólisis y transfructosilación enzimática.

Santos & Maugeri (2007) reportaron que la temperatura y la concentración de sacarosa fueron los parámetros más importantes en la producción de fructooligosacáridos a partir de sacarosa utilizando inulinasa de *Kluyveromyces*





*marxianus* var. *bulgaricus*, utilizando temperaturas desde 40 hasta 50 °C y concentraciones de sacarosa entre 45 y 65%.

Kuhn *et al* (2016) alcanzaron un mayor rendimiento de fructooligosacáridos, con una inulinasa comercial inmovilizada de *Aspergillus niger*, la reacción se llevó a cabo por 24 h a 50 °C en un fluido presurizado y se utilizó sacarosa al 60% m/v como sustrato alcanzándose rendimientos del 65.71%. Los productos de reacción fueron 26.62% de kestosa, 30.62% de nistosa y 8.47% de fructosilnistosa.

Con lo anterior, para alcanzar un mayor rendimiento de FOS, se necesitan altas concentraciones de sacarosa o condiciones especiales como medios bifásicos, presurizados o medios no acuosos. En el presente trabajo se buscó la producción de fructooligosacáridos reduciendo la concentración de sustrato y utilizando mezclas eutécticas como medio no convencional de reacción.

## Glicosilhidrolasas

Las glicosilhidrolasas (GH) son enzimas que la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular ha clasificado con el código EC 3.2.1.X, donde los tres primeros dígitos indican que son enzimas capaces de hidrolizar enlaces O- y S- glicosídicos, y el cuarto número hace referencia al tipo de sustrato (Casa, 2018).

Una característica importante en este trabajo es que a pesar de que las GH son enzimas que naturalmente hidrolizan el enlace glicosídico de los carbohidratos, modificando las condiciones de reacción, ya sea incrementando la concentración de sustrato y/o disminuyendo la cantidad de agua del medio de reacción estas enzimas son capaces de realizar transglicosilación por una disminución de la actividad del agua. Igualmente, estas reacciones pueden llevarse a cabo por glicosiltransferasas, transglicosidasas, así como con fosforilasas de glucósidos, esto aprovechando su selectividad con la sacarosa y teniendo una amplia gama de sustratos aceptores (Mangas-Sánchez & Adlercreutz, 2015).

Algunas GH también se pueden clasificar como exo- o endo-, dependiendo de si son capaces de cortar el enlace glicosídico en el extremo o en enlaces internos de





la cadena de un polisacárido, respectivamente. Las GH exo pueden ser específicas por el extremo reductor o no reductor (Casa, 2018).

Las hidrólisis catalizadas por estas enzimas han sido estudiadas y se ha propuesto un mecanismo de inversión o de retención dependiendo de si se invierte o se retiene la configuración del carbono anomérico (Davies & Henrissat, 1995; Koshland Jr., 1953)

En las enzimas que utilizan un mecanismo de retención, la distancia entre los dos residuos catalíticos es menor (4.5 - 5.5 Å) (Mccarter & Withers, 1994). En este caso uno de los residuos actúa como nucleófilo y el otro como ácido o base. La reacción ocurre en dos pasos. En un primer paso (glicosilación), el ácido/base (actuando como ácido) protona el oxígeno del enlace glicosídico, y el nucleófilo ataca al carbono anomérico, rompiendo el enlace glicosídico y formando un intermediario covalente entre el glicósido y la enzima. En un segundo paso (deglicosilación), se rompe el enlace del intermediario enzima-glicosilo por acción de una molécula de agua, que es desprotonada por el residuo ácido/base (actuando como base) y se libera el residuo glicosídico con la misma configuración que el sustrato original (Figura 4) (Davies & Henrissat, 1995; Koshland Jr., 1953). Cuando la ruptura del enlace del intermediario enzima-glicosilo es por acción de otra molécula con un grupo funcional OH, como por ejemplo otro azúcar o un alcohol, y no por una molécula de agua, se da lugar a un proceso de transglicosilación lo cual se aprovechará en este proyecto usando la inulinasa para llevar esta reacción. Una vez teniendo un panorama de estas enzimas se puede hablar más de ellas.



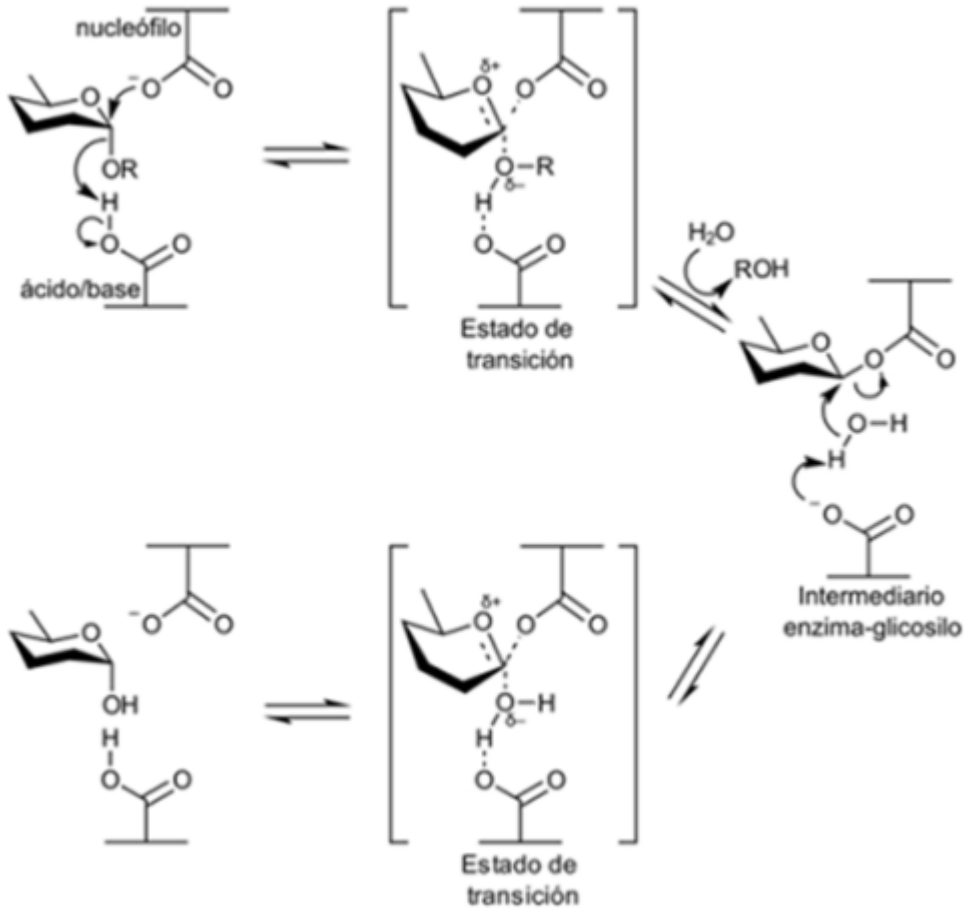


Figura. 4: Mecanismo de reacción de las Glicosidasas por retención modificado de (Lee, 2017).

## Inulinasas

Las inulinasas pertenecen a la familia de las glicosilhidrolasas GH32; estas enzimas catalizan la hidrólisis de enlaces  $\beta$ -(2,1) fructosílicos. Se clasifican principalmente en dos grupos, exo- y endoinulinasas, que cortan el enlace en diferente posición produciendo diferentes productos de reacción (Figura 5).

Las exoinulinasas hidrolizan los enlaces terminales no reductores presentes en la inulina produciendo fructosa, por su parte las endoinulinasas actúan aleatoriamente sobre los enlaces glicosídicos  $\beta$ -(2,1) internos de la inulina y producen fructooligosacáridos, los cuales poseen bajo peso molecular y grado de polimerización menor a 10 unidades de fructosa (Singh, *et. al.*, 2017).





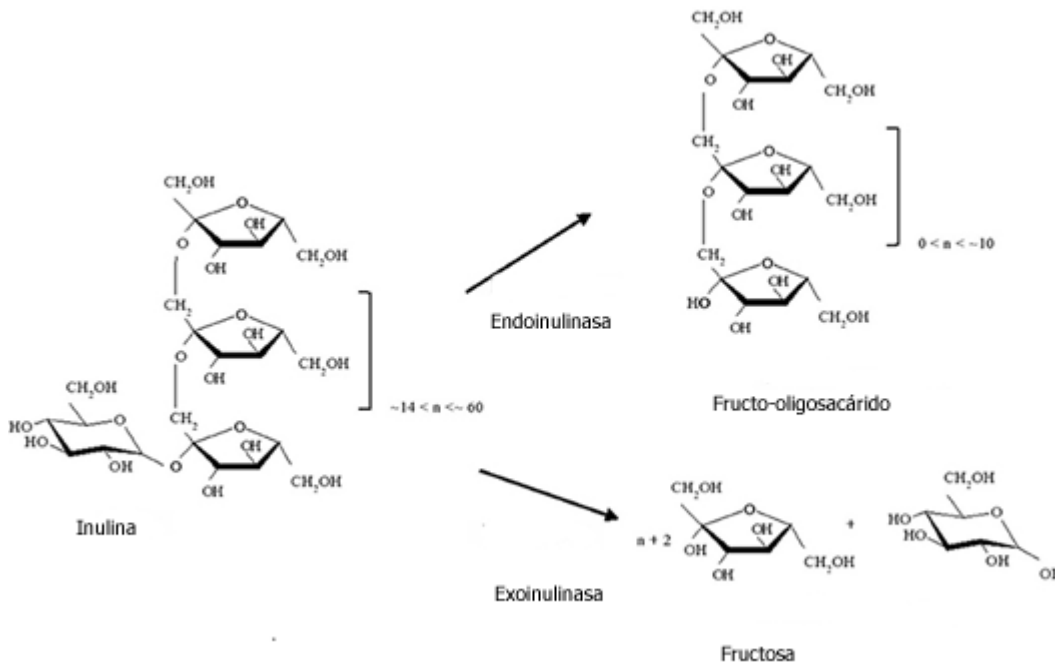


Figura. 5: Esquema de productos obtenidos por inulinasas a partir de la inulina (Fernandes, 2014).

Las enzimas del grupo GH 32, comparten un dominio N-terminal  $\beta$  propela formado por cinco hojas- $\beta$ , dispuestas alrededor de una cavidad central en donde se encuentra el sitio activo (dominio catalítico). Dentro de este dominio hay tres residuos catalíticos que están rodeados de secuencias conservadas en la familia GH 32. Un ácido aspártico se encuentra en la secuencia NDPNG y actúa como nucleófilo, mientras que la función del ácido aspártico en el motivo conservado RDP es estabilizar el estado transitorio y finalmente el ácido glutámico en EC es el catalizador ácido/base. Estos aminoácidos son esenciales en la unión al sustrato y la hidrólisis. Otro dominio que caracteriza a este grupo de enzimas es la presencia del grupo  $\beta$ -sándwich (Álvaro-Benito *et al.*, 2012). En la figura 6 se muestra la estructura de la inulinasa de *Aspergillus ficuum* destacando la triada catalítica en un rectángulo rojo y el sustrato en negro. Para llevar a cabo la catálisis se requieren condiciones que se han estudiado y se presentan a continuación.



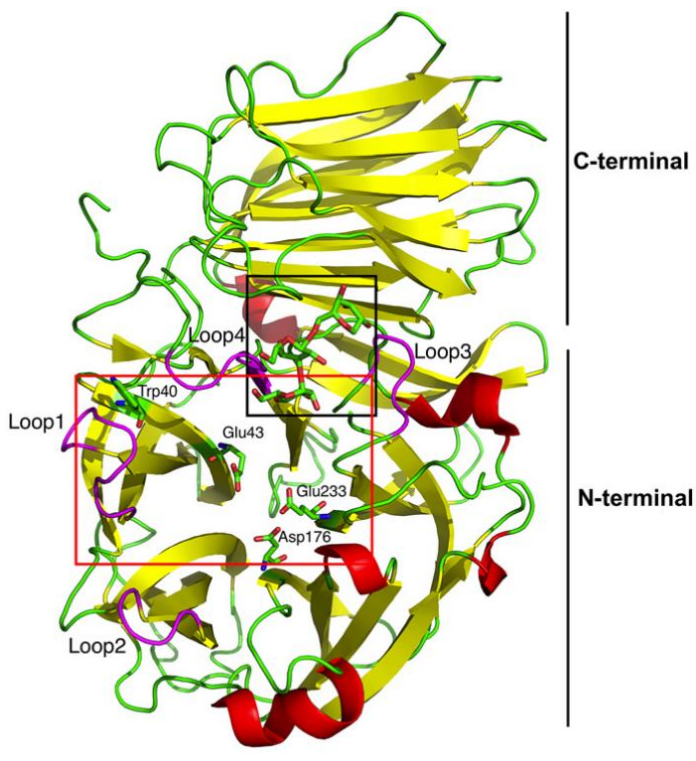


Figura. 6: Representación de la estructura cristalográfica de la inulinasa INU2 proveniente de *Aspergillus ficuum* (Pouyez et al., 2012).

## Propiedades catalíticas de las inulinasas

Los principales parámetros a tener en cuenta durante una reacción química son la temperatura y el pH.

El efecto del pH sobre la actividad de la inulinasa depende de la fuente de obtención. La inulinasa fúngica tiene un intervalo de pH óptimo entre 4.5 y 7.0, mientras que el de la inulinasa de levadura está entre 4.4 y 6.5. Por otro lado, la inulinasa bacteriana tiene máxima actividad entre valores de pH del de 4.8 a 7.0 (Ricca et al., 2007). En otro estudio el pH óptimo que se reportó de una inulinasa purificada de hongos y cepas de levadura estaba en el rango de 4.5 - 6.0 (Chi et al., 2009).

Siguiendo con otras inulinasas, la exoinulinasa de las bacterias normalmente tienen un pH óptimo de 6.0, pero hay casos diferentes por ejemplo el pH óptimo de la exoinulinasa de *Bacillus polymyxa* fue de 7 (Chi et al., 2009). La actividad endoinulinasa de *Penicillium* spp. TN-88 y *Arthrobacter* spp. S37 fue óptima a pH





5.2 y 7.5, respectivamente; estos hallazgos muestran que el pH óptimo de la actividad enzimática de las bacterias es más alto que el de los hongos (Chi *et al.*, 2009). Con esto queda clara la importancia de conocer el origen de la enzima que se usa en los diferentes procesos. En el caso de este trabajo se utilizará una inulinasa de origen fúngico donde se ha reportado un pH óptimo de 5 (Morelos-López, 2020).

La temperatura, se considera un parámetro importante en la producción de fructooligosacáridos. Se ha demostrado que un cambio de temperatura tiene un efecto positivo en la síntesis de estos, por ejemplo, cuando hay un aumento de 40°C a 50°C existe una mejor producción (Santos & Maugeri, 2007). Ricca *et al* (2007) reportaron que las temperaturas óptimas para las inulinasas de bacterias y levaduras eran generalmente más altas que las de los hongos y existe la necesidad de una enzima termoestable para favorecer la solubilidad de la inulina. En otro estudio la temperatura óptima para la producción de fructooligosacáridos a partir de inulina usando una endo inulinasa recombinante era de 55 °C y 50°C en un sistema de lote y uno continuo respectivamente (Singh *et al.*, 2020). La importancia de la temperatura en este trabajo toma relevancia al tener un medio no convencional donde los sustratos no tienen la solubilidad que presentarían en medio acuoso, sin embargo, confiere otras ventajas al proceso como el favorecimiento de la transfructosilación sobre la hidrólisis.

En el grupo de trabajo de la Dra. Carmina Montiel Pacheco se han desarrollado diversos trabajos enfocados en el uso de inulinasas para su caracterización y uso en producción de FOS ya sea por hidrólisis de inulina o transfructosilación de sacarosa. Se han estudiado inulinasas de *Kluyveromyces marxianus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, *Fusarium incarnatum* y *Aspergillus niger*, esta última de una mezcla comercial llamada Novozym® 960. Esta experiencia abre el camino a buscar otras alternativas de mejora en las condiciones del proceso. Un camino poco explorado es el uso de medios no convencionales para la producción de FOS a partir de sacarosa que será el eje de este trabajo.





## Mezclas eutécticas

Como se mencionó anteriormente en el mecanismo de reacción, una molécula polar, agua, por ejemplo, lleva un paso importantísimo, realizar un ataque nucleofílico. Si se sustituye esta molécula en el medio y el ataque se lleva a cabo por otra molécula, por ejemplo, otro azúcar es posible formar FOS o incluso con un alcohol es posible sintetizar un glucósido por vía enzimática. Para esto es importante reducir el agua del medio, lo que nos lleva a una reducción en su actividad, una opción es llevar la reacción en medios no convencionales (Hollá *et al.*, 2021).

El uso de medios no convencionales puede mantener o ayudar a la estabilidad y actividad enzimática para cierto tipo de reacciones, como las llevadas por lipasas lacasas, peroxidasa e hidrolasas. En la tabla 2 se muestran ejemplos del uso de enzimas, en este caso lipasas y subtilisina Calsberg que se han llevado a cabo en medios orgánicos como hexano, dodecano y 2-metil-butanol, en líquidos iónicos y en mezclas eutécticas como cloruro de colina (ChCl) con glicerol o urea y acetato de colina (ChAc) con glicerol. La tendencia en medios no convencionales ha conducido al uso de medios más verdes. Este trabajo se centrará en las mezclas eutécticas.





Tabla 2. Reacciones enzimáticas en medios no convencionales.

Enzima	Medio	Referencia
Lipasas de <i>Pseudomonas</i> spp.	Hexano y dodecano	(Pogorevc <i>et al.</i> , 2002)
Subtilisina Carlsberg de <i>Bacillus licheniformis</i>	2-metil-2-butanol	(Kim <i>et al.</i> , 2000)
Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i>	sulfato de imidazolio y éter de polioxietilen(10) cetilo	(Itoh <i>et al.</i> , 2006)
Subtilisina Carlsberg de <i>Bacillus licheniformis</i>	[CH <sub>3</sub> (OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -Et-Im][Tf <sub>2</sub> N], [CH <sub>3</sub> (OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -Et <sub>3</sub> N][Tf <sub>2</sub> N]	(Zhao <i>et al.</i> , 2010)
Subtilisina Carlsberg de <i>Bacillus licheniformis</i>	ChAc: Glicerol, ChCl: Glicerol / agua ChCl: Glicerol	(Zhao <i>et al.</i> , 2011)
Lipasa de <i>Candida antarctica</i>	ChCl: Glicerol ChCl: U ChCl: Glicerol con adición de agua	(Kleiner & Schorken, 2014)

Las mezclas eutécticas de bajo punto de fusión (DES) se obtienen al mezclar dos o más sólidos inmiscibles en una proporción determinada que sufren un cambio de fase sólida a líquida a una temperatura dada, llamada punto eutéctico, representado en un diagrama en la Figura. 7. La mezcla se comporta a estos efectos como si fuese un líquido. Un ejemplo de esto es la mezcla entre cloruro de colina y urea, por separado los puntos de fusión de estas sustancias son de 302 °C y 133 °C respectivamente, sin embargo, al mezclarlos pueden llegar a tener un nuevo punto de fusión a los 12 °C (Mbous *et al.*, 2017).



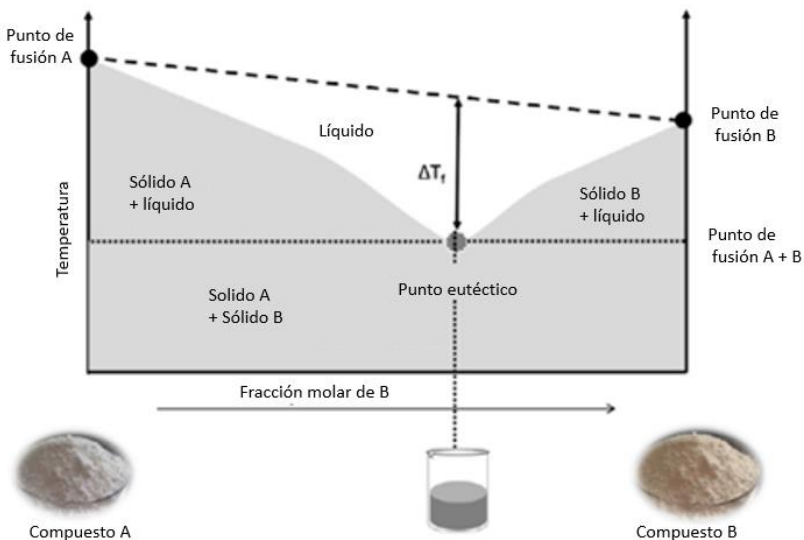


Figura. 7: Diagrama de fases de dos componentes en mezclas eutécticas adaptado de (Pena-Pereira & De La Calle, 2019).

Sus propiedades se las confiere la vasta red de puentes de hidrógeno formada en los DES entre los hidrógenos y el cloruro de la sal cuaternaria de amonio como se observa en la Figura. 8. Las propiedades que hacen atractivos a los DES son las siguientes: bajos puntos de fusión, baja volatilidad, no inflamabilidad, baja presión de vapor, naturaleza dipolar, estabilidad química y térmica, alta solubilidad, facilidad de almacenamiento debido a su inercia química con el agua, baja toxicidad y alta biodegradabilidad siendo compuestos provenientes y presentes en la naturaleza. Otro parámetro a destacar es la constante dieléctrica que en el caso de la mezcla cloruro de colina con glicerol en relación molar 1:2, que es la mezcla principal usada en este trabajo, se ha reportado con un valor de 35 que es menor a la del agua que se encuentra en 80 (Kutlu et al., 2022).



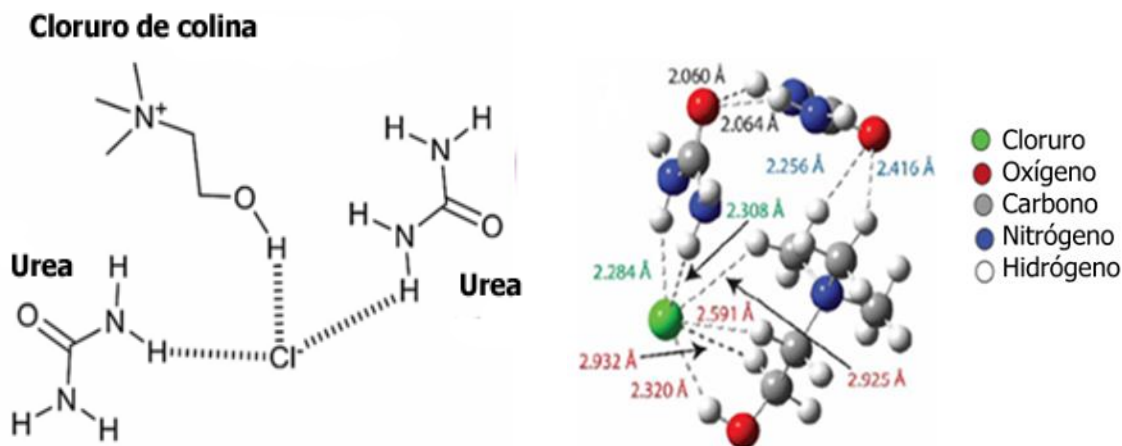


Figura. 8: Interacciones de puentes de hidrógeno entre la urea y el ion cloro del cloruro de colina (Wagle et al., 2016).

Una de las razones mencionadas por las que las mezclas eutécticas son atractivas es su “inocuidad” con el medio ambiente, esto al ser biodegradables y de bajo costo de producción, contrasta con otro tipo de solventes no convencionales como lo son los líquidos iónicos. Se puede agregar a la lista de ventajas que no son tóxicos, no son volátiles y no son flamables (Pätzold et al., 2019). Su “simplicidad” y accesibilidad, también le dan una ventaja frente a otras técnicas que se emplean para mejorar la estabilidad y actividad enzimática como pueden ser las técnicas de inmovilización y la mutagénesis. En este trabajo, se buscó sacar ventaja del uso de mezclas eutécticas en la reacción de transglicosilación con una inulinasa probando diversos medios y sustratos enfocándose en la producción de FOS.

En los estudios de biocatálisis que se han reportado, el uso de DES se ha caracterizado por el incremento significativo de la estabilidad de las enzimas además de incrementar la eficiencia enzimática por mejoramiento de enantioselectividad y regio selectividad (Mbous et al., 2017), pero esto no sucede en todos los casos.

En la formación de DES existen muchas moléculas capaces de formar redes de puentes de hidrógeno y aquellos que tienen una mayor propensión a la formación, pueden ser por un mayor número de grupos hidroxilo en su cadena que estabilizarán y mejorarán la actividad enzimática que las de menor propensión. Por otro lado es posible que los sustratos de una reacción sean capaces de formar estos puentes de hidrógeno y ser parte de la mezcla eutéctica (Hansen et al., 2021).





En general, los resultados obtenidos indican la superioridad de los DES sobre disolventes tradicionales, en términos de los rendimientos de la reacción, la pureza de los productos, la disponibilidad de reactivos, el tiempo de reacción, la enantioselectividad y regio selectividad del catalizador, el reciclaje del catalizador y el disolvente, y la estabilidad y actividad del biocatalizador. Estos rasgos superiores se atribuyen a las características intrínsecas de los DES, como su amplia y fuerte red de puentes de hidrógeno. La estabilidad de una enzima en los DES se origina en las interacciones entre los componentes del DES (Donador de enlace de hidrógeno y aceptor de enlace de hidrógeno) y las fracciones superficiales de la enzima, que generalmente implican puentes de hidrógeno. Como resultado, de este complejo supramolecular rígido, la superficie de la enzima está acoplada o inmovilizada a la estructura de DES, promoviendo así la estabilidad de la proteína (Monhemi *et al.*, 2014).

En la tabla 3 se muestran algunos trabajos de producción de glucósidos vía enzimática en estos medios, lo que nos habla de la factibilidad de síntesis en mezclas eutécticas que al ser medios disminuidos en agua desfavorecen la hidrolisis de los productos buscados. En cuanto a producción de FOS parece no existir literatura de casos con uso de mezclas eutécticas.

Tabla 3: Reacciones de transglicosilación llevados a cabo en medios eutécticos.

Glucósido	Enzima	Referencia
Tirosol $\beta$ Fructosido y Tirosol $\beta$ galactosido	$\beta$ galactosidasa y $\beta$ fructofuranosidasa de <i>Kluyveromyces lactis</i>	(Hollá <i>et al.</i> , 2021)
Alquil glucósido	$\alpha$ amilasa de <i>Thermotoga maritima</i>	(Miranda-Molina <i>et al.</i> , 2019)
Butil glucósido	Glucosidasa de <i>Streptomyces griseus</i>	(Uhoraningoga <i>et al.</i> , 2021)







## Hipótesis

La transfructosilación enzimática de la sacarosa a bajas concentraciones podrá ser catalizada por la enzima inulinasa Novozym® 960 en mezclas eutécticas como medio de reacción.

## Objetivos

### Objetivo general

Establecer un medio de reacción no convencional y sus condiciones mediante el uso de mezclas eutécticas a fin de llevar a cabo una reacción de transglicosilación enzimática para la obtención de un producto de valor agregado.

### Objetivos específicos

- Estudiar diversas mezclas eutécticas empleando cloruro de colina como aceptor de puente de hidrogeno y diversos donadores de puente de hidrógeno para que sirvan como medios de reacción.
- Determinar la actividad enzimática de la inulinasa en las mezclas eutécticas.
- Conocer la estabilidad enzimática de la inulinasa en las mezclas eutécticas y complementar con una simulación *in silico*.
- Establecer las mejores condiciones de reacción para la obtención de fructooligosacáridos en el medio no convencional.
- Realizar la separación de los fructooligosacáridos de la mezcla de reacción.
- Identificar la longitud de cadena de los fructooligosacáridos obtenidos.
- Determinar la factibilidad del uso de compuestos fenólicos o alcoholes alifáticos como sustratos aceptores para transglicosilación.





## Metodología

La metodología realizada se puede resumir en los pasos de la Figura 9, la cual se explicará a mayor detalle a continuación.

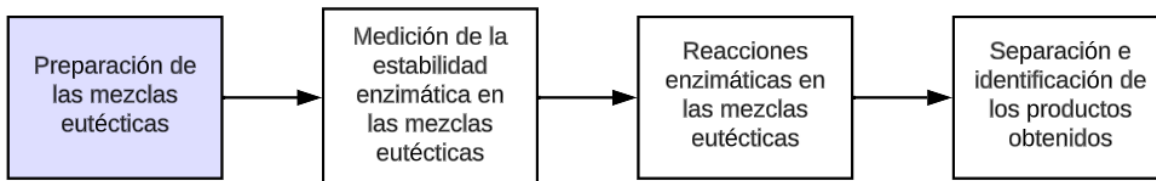


Fig. 9 Resumen de los pasos llevados a cabo en el presente trabajo.

### Mezclas eutécticas

En una primera etapa, se realizó la preparación de las mezclas eutécticas de bajo punto de fusión en relación molar 1:2 con cloruro de colina y glicerol, propilenglicol y etilenglicol además de una relación 1:2 en el caso de cloruro de colina con sacarosa (Tabla 4). Se prepararon 25 g de cada mezcla, posteriormente se llevaron, a 80°C con agitación constante, como lo describe en su metodología (Zhekenov et al., 2017), hasta formar una mezcla homogénea, que se dejó enfriar y se observó que no hubo cambio en su apariencia.

Tabla 4: Mezclas eutécticas de bajo punto de fusión usadas.

Clave	Mezcla	Relación
ChCl-G	Cloruro de colina - Glicerol	1:2
ChCl-PG	Cloruro de colina - Propilenglicol	1:2
ChCl-EG	Cloruro de colina - Etilenglicol	1:2
ChCl-Sac	Cloruro de colina - Sacarosa	1:2

### Solubilidad de los sustratos en DES

Para evaluar la solubilidad de los sustratos, en tubos Eppendorf se añadió 1 mL de DES y se le adicionó 0.1 g de sacarosa con agitación constante para disolverla,





posteriormente se le añadió agua destilada de 10  $\mu\text{L}$  en 10  $\mu\text{L}$  hasta lograr la disolución, en el caso de los DES: cloruro de colina con glicerol se añadieron hasta 350  $\mu\text{L}$ ; cloruro de colina con etilenglicol 300  $\mu\text{L}$  y cloruro de colina con propilenglicol 450  $\mu\text{L}$ .

Para evaluar otros posibles sustratos de reacción se probó la solubilidad del ácido gálico en DES ChCl – G con 30% agua llegando hasta 30 mg/mL.

### **Estabilidad de la enzima en DES**

Para evaluar la estabilidad enzimática, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de enzima comercial, que corresponden a 6.5 U de Novozym® 960 a los diferentes DES y se preparó una solución control de buffer de acetatos pH 5, en cada caso a los DES se les añadió 30% de solución buffer, dando volúmenes totales de 1.1 mL. Los diferentes medios fueron puestos en agitación constante a 450 rpm, tomando alícuotas de 20  $\mu\text{L}$  a los 20 minutos, a las 24 h, 48 h y 72 h a temperatura ambiente. De igual manera, se tomaron muestras para una estabilidad prolongada en el DES ChCl-G de 7, 14, 21 y 28 días.

La reacción de hidrólisis de la sacarosa se inició con los 20  $\mu\text{L}$  de enzima, cuya actividad corresponde a 1.3 U, en un volumen de 1 mL de una solución al 1% de sacarosa, la reacción se llevó a cabo a pH 5 y 50 °C durante 30 minutos con agitación. Posteriormente, los azúcares reductores, productos de la reacción, se cuantificaron mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) llevando muestras de 0.1 mL de reacción en 0.6 mL de DNS con 0.2 mL de buffer de acetatos pH 5 a 90°C por 5 minutos, enfriando con hielo y diluyendo con 4 mL de agua para posteriormente medir su absorbancia a 540 nm. Por otro lado, se midió la estabilidad enzimática a diferentes porcentajes de buffer en la mezcla eutéctica ChCl-G: 0, 10, 20 y 30 %. Las unidades enzimáticas se definen como los micromol de fructosa producida por unidad de tiempo. La primera etapa se esquematiza en la figura 10.



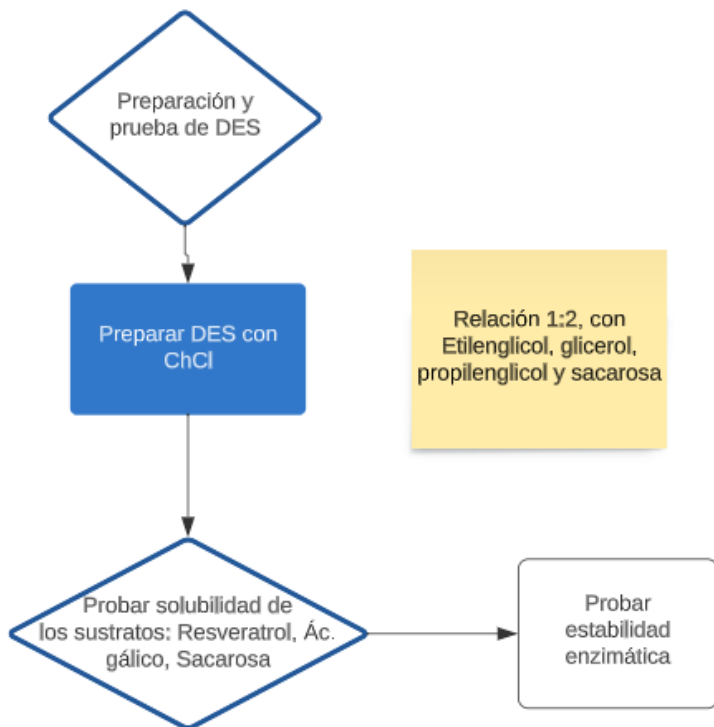


Figura. 10: Etapa I de experimentación, síntesis de DES y estabilidad de sustratos y enzima

### Reacción enzimática en DES

En una segunda etapa, se llevó a cabo la reacción de transfructosilación con sacarosa en tubos Eppendorf en volúmenes de 1 mL. En 1 mL de DES (cloruro de colina glicerol con 30% de buffer), se agregó 0.1 g de sacarosa y 6.5 U de Novozym® 960, la reacción se llevó a cabo en un agitador Thermomixer para tubos Eppendorf a 450 rpm. Las condiciones de reacción fueron pH 5 y 50°C durante 30 minutos.

Para conocer las mejores condiciones en este medio, se realizaron reacciones variando la temperatura (25, 40, 50 y 60 °C), cantidad de sustrato en soluciones de diferente porcentaje de sacarosa (1, 5, 10% m/v), cantidad de enzima en mg de proteína (0.05, 0.125, 0.25, y 0.5 mg con 13.46 U/mg<sub>proteína</sub>) y tiempo de reacción en minutos (5, 10, 20, 30). Los productos de reacción fueron seguidos por cromatografía de capa fina.



Las reacciones para obtener un glucósido fenólico o alquílico se llevaron en 1 mL de DES ChCl-G con 30% de buffer y 6.5 U, añadiendo 0.1 g de sacarosa, 10 mg de ácido gálico o 10% v/v de butanol, heptanol u octanol a 50 °C por 30 minutos en un agitador Thermomixer para tubos Eppendorf a 450 rpm.

### Cromatografía de capa fina

Para identificar tanto los sustratos como los productos de reacción, se corrieron cromatografías de capa fina, se realizaron controles con sacarosa, glucosa, fructosa y el medio para comparar y discernir la presencia de un nuevo compuesto, la fase móvil en las eluciones fue butanol, metanol, agua y ácido acético en relación 3:2:0.7:0.3, respectivamente. Se aplicaron alícuotas de 3  $\mu$ L diluidas 1:10. Una vez secas, las cromatoplasmas se revelaron con una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5% en etanol y orcinol (10 mg/mL), se roció la solución a la placa y se calentó en una parrilla para revelar la presencia de compuestos. La segunda etapa se esquematiza resumidamente en la figura 11.

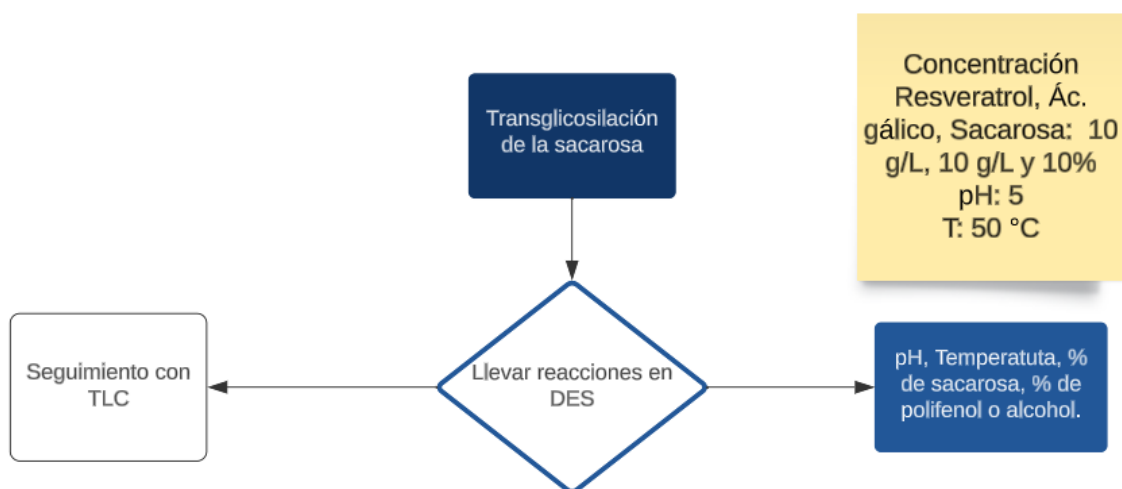


Figura. 11: Etapa II de experimentación, Seguimiento de reacción en TLC.



### **Efecto del ácido gálico en la actividad enzimática**

El seguimiento de pérdida de actividad se realizó variando la concentración de ácido gálico en mg/mL (0, 5, 10, 20, 25) en el medio DES ChCl-G al 30% de buffer con de 1 % de sacarosa y midiendo los productos de hidrólisis por el método de reacción de DNS previamente descrito.

### **Cromatografía preparativa para separación de productos**

En una tercera etapa, una vez conocida la mezcla que mantiene actividad enzimática y además produce un compuesto que se pueda presumir es el producto deseado, se llevó a cabo la reacción de transfructosilación a 50 ° C con 10% de sacarosa en el medio ChCl-G al 30% de buffer de acetatos pH 5. Se separaron los componentes en una cromatografía preparativa con la fase móvil: butanol, metanol, agua en relación 3:2:1 se dejó secar y a través de un duplicado que fue revelado con orcinol, como previamente se explicó, funcionó de guía para posteriormente raspar en un duplicado las diferentes bandas de la placa para que en 1 mL de agua destilada los componentes fueran separados de la sílica disolviéndolos.

### **Identificación de los productos**

Una vez separadas las fracciones obtenidas, se liofilizaron y se reconstituyeron en volúmenes de 200 µL para que, por medio de cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección amperométrica de pulsos, HPACD-PAD por sus siglas en inglés, se determinara el tipo de FOS producidos. Las muestras se diluyeron 10 veces y se centrifugaron 2 veces por 5 min a 13,000 rpm; se filtraron y se colocaron 100 µL en un vial para su análisis. Fueron procesadas por medio de una columna CarboPac PA 200 (3x 250 mm, Dionex). Durante las corridas se emplearon dos fases: NaOH 100 mM (fase A) y NaOH 100 mM / Acetato de sodio 0.5 M (fase B), a un flujo de 0.5 mL/min y 30°C. El tiempo total de cada corrida fue de 55 minutos, repartidos de la siguiente manera:

0-25 min: Gradiente 80% A, 20% B: 0-0.1M acetato de sodio





25 min: Directo 10% A, 90% B: 0.1M-0.45M acetato de sodio

35 min: Directo 99% A, 1% B (lavado)

35-55 min: Directo 99% A, 1% B (estabilización línea base)

La tercera etapa se esquematiza resumidamente en la figura 12.



Figura. 12: Etapa III de experimentación, Separación, identificación y caracterización del producto.

### Análisis *in silico*

Para tener una visión más amplia del comportamiento de la inulinasa, en las mezclas eutécticas, se llevó a cabo una simulación *in silico* para tener datos que expliquen su estabilidad en estos medios.





### 1. Preparación del modelo

Se descargó del *Protein Data Bank* (PDB) (Berman, 2000) la estructura homodimérica de la exoinulinasa INU1 de *Kluyveromyces marxianus* con clave 6J0T. Se completaron las cadenas laterales no asignadas y eliminaron las moléculas de agua y otros ligandos con el programa UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004). Este programa también se empleó para completar los segmentos estructurales faltantes con Modeller (≤ali, 1995).

### 2. Dinámica molecular

El modelo se solvató en medio acuoso y en una mezcla eutéctica para posteriormente ser sometido a 1.0  $\mu$ s de dinámica molecular convencional empleando el campo de fuerza CHARMM36 (Huang & Jr, 2013) implementado en el programa GROMACS v2021 (Abraham *et al.*, 2015). Para el sistema solvatado en agua se empleó el modelo de agua TIP3P con 86976 moléculas de agua, mientras que para la mezcla eutéctica se incorporaron 9350 moléculas de glicerol, 4675 moléculas de colina y 30593 moléculas de agua. En el caso del sistema con agua se adicionaron 300 iones  $\text{Na}^+$  y 240  $\text{Cl}^-$  para neutralizar la carga del sistema y alcanzar una concentración 0.15 M. Por su parte, el sistema en el medio eutéctico fue neutralizado mediante la adición de 4629 iones  $\text{Cl}^-$ . Se llevaron a cabo aproximadamente 5,000 pasos de minimización de energía para cada sistema empleando el algoritmo *steepest descent*. Los sistemas optimizados se sometieron a un ensamble canónico (NVT) y un ensamble isotérmico-isobárico (NPT) por periodos de 5 ns. Para las simulaciones, se fijó la temperatura a 300 K con el termostato de V-rescale y una presión de 1.0 bar con el baróstato de Parinello-Rahman. El cálculo del potencial de Lennard-Jones e interacciones electrostáticas de corto alcance se calcularon entre los 0.0 y 1.0 nm, después de los cuáles se calcularon con el método de la partícula en la malla de Ewald (PME). La lista de vecinos se actualizó cada 20 pasos y se constriñeron los enlaces que involucraban hidrógenos con el algoritmo de LINCS (Hess *et al.*, 1997).

Para la obtención de la raíz de la desviación cuadrática media (RMSD), raíz de la fluctuación cuadrática media (RMSF), contactos y radio de giro se emplearon las







herramientas de análisis de GROMACS. Los gráficos se generaron con el programa Gnuplot v5.0 (Williams & Kelley, 2016) y las figuras con el visualizador PyMOL v2.5 (Schrödinger, 2022).

## Resultados

### Mezclas eutécticas

En la preparación de DES de cloruro de colina con glicerol, propilenglicol y etilenglicol, respectivamente, en relación 1:2 se observó que, a 80°C con agitación constante durante 10 minutos, ya se cuenta con un líquido totalmente homogéneo. Sin embargo, se dejó con agitación 20 minutos más para asegurar la formación de DES. Esta preparación se contrasta con la de cloruro de colina sacarosa, la cual formó un líquido homogéneo muy viscoso como se reporta en otros trabajos (Xu et al., 2018).

### Solubilidad de los sustratos en DES.

En cuanto a la solubilidad de los sustratos, la sacarosa en DES (ChCl-G) es poco soluble, para solubilizarse se añadió agua destilada al medio hasta tener el 26% para disolver 0.1 g a una temperatura de 25°C. En estas condiciones se tiene una solubilidad de 0.22 mol/L, para incrementar la concentración, se probó la solubilidad a 50°C (temperatura a la cual se llevarían a cabo la reacción enzimática) alcanzando una solubilidad de 0.29 mol/L aproximadamente la cual de igual manera se alcanzaba al llegar a un contenido de agua del 30%. Cabe señalar que aun a 30% de agua la mezcla eutéctica se conserva, de acuerdo a Ferreira *et al.*, (2021) y Weng & Toner, (2018) la mezcla eutéctica ChCl-G 1:2 conserva las interacciones entre todos los componentes a esta condición. En el caso de propilenglicol para disolver 0.1 g de sacarosa se necesitó agregar 450 µL lo que nos dio una solubilidad a esas condiciones de 69 mg/mL finalmente en el etilenglicol se añadieron 300 µL alcanzándose una solubilidad de 0.22 mol/L. El medio que necesitó menos cantidad de agua para solubilizar la sacarosa fue la mezcla con etilenglicol.





La solubilidad del ácido gálico, posible sustrato para llevar a cabo la reacción de transglicosilación, es mayor que la de la sacarosa en el medio eutéctico cloruro de colina glicerol, y considerablemente mayor que la que presenta en agua, para fines de este trabajo no se determinó, pero excede los 30 mg/mL. Para las reacciones fácilmente se disolvió la cantidad necesaria de 10 mg para mantener una relación molar en exceso de ácido gálico: sacarosa como en algunos trabajos anteriores de glicosilación con polifenoles (Dirks-Hofmeister *et al.*, 2015; Hollá *et al.*, 2021).

En cuanto a miscibilidad, los alcoholes lineales como el butanol, heptanol y octanol, no fueron miscibles en la mezcla eutéctica ChCl-G, pero bien como sistemas bifásicos se probaron como medios para producir un alquil-glicósido.

### **Estabilidad de la enzima en DES**

La determinación de la estabilidad de la inulinasa, se llevó a cabo una vez conociendo que los posibles sustratos eran solubles en DES con 30% de buffer de fosfatos pH 5. Este sistema ahora en adelante se mencionará como DES ya que mantiene ciertas propiedades de la red de enlaces características aun con este porcentaje de agua (Weng & Toner, 2018). La mezcla enzima-DES se agitó durante 24 h, 48 y 72 h. Se tomó una alícuota y se llevó a cabo la reacción en el medio acuoso con 1 % de sacarosa, los resultados de la actividad residual a estos tiempos, medidos por DNS, se muestran en la figura 13. Los resultados se muestran como % de la actividad residual tomando como base o control la reacción donde la enzima se almacenó en buffer de acetatos pH 5. Se determinó la estabilidad de la enzima en la mezcla con propilenglicol y con etilenglicol con 30% de buffer y 3 diferentes tiempos de almacenamiento en las mezclas eutécticas, donde se aprecia una actividad enzimática similar en los DES con glicerol a 48 y 72 horas y en propilenglicol con respecto al buffer. Por otro lado, la mezcla eutéctica con etilenglicol perdió su actividad en un 97% en 24 horas.



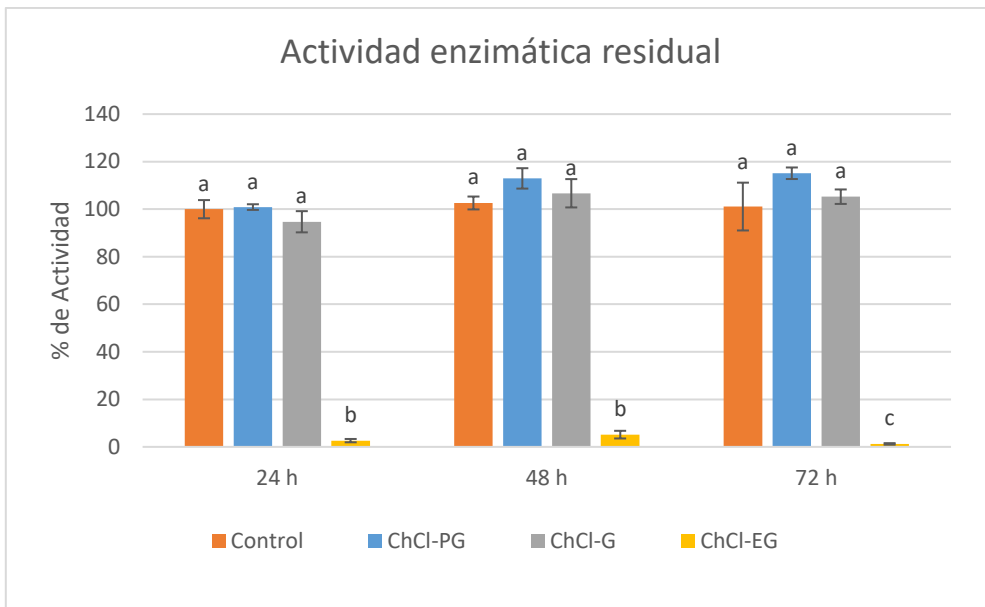


Figura. 13: Gráfica del porcentaje de actividad con relación a las diferentes mezclas eutécticas. Reacciones de hidrólisis a 50 °C por 30 min en soluciones al 1% de sacarosa. PG: DES cloruro de colina – propilenglicol. G: DES cloruro de colina – Glicerol EG: DES cloruro de colina – Etilenglicol. En todos los casos con 30% de buffer. Ensayo llevado por triplicado

Con relación al experimento anterior, un aumento en el porcentaje de agua se tradujo en un aumento de la estabilidad enzimática, Para el caso del etilenglicol, se hizo una comparación de las condiciones, donde la enzima pierde su actividad versus una nueva condición con 10% más de buffer manteniendo como disolvente principal la mezcla eutéctica para quedar en un total de 40% de agua. En la figura 14 se observa como el aumento de 10% en la relación buffer-DES ayuda a mantener la estabilidad enzimática sin perder la condición donde el solvente principal es el medio no convencional, por otro lado es posible que la mezcla deje de tener las propiedades de un DES como menciona (Zhekenov *et al.*, 2017) donde en el caso de cloruro de colina – etilenglicol y cloruro de colina glicerol, el número de puentes de hidrógeno HBD-cloruro decrecen más allá de un contenido de agua de 50% mol y se va perdiendo la estructura de red que los caracteriza. En el caso de cloruro de colina – etilenglicol, otro estudio determinó que a este porcentaje de agua (40%) se tendría una disolución ya que se perdería la configuración de enlaces de un DES (Kaur *et al.*, 2020).



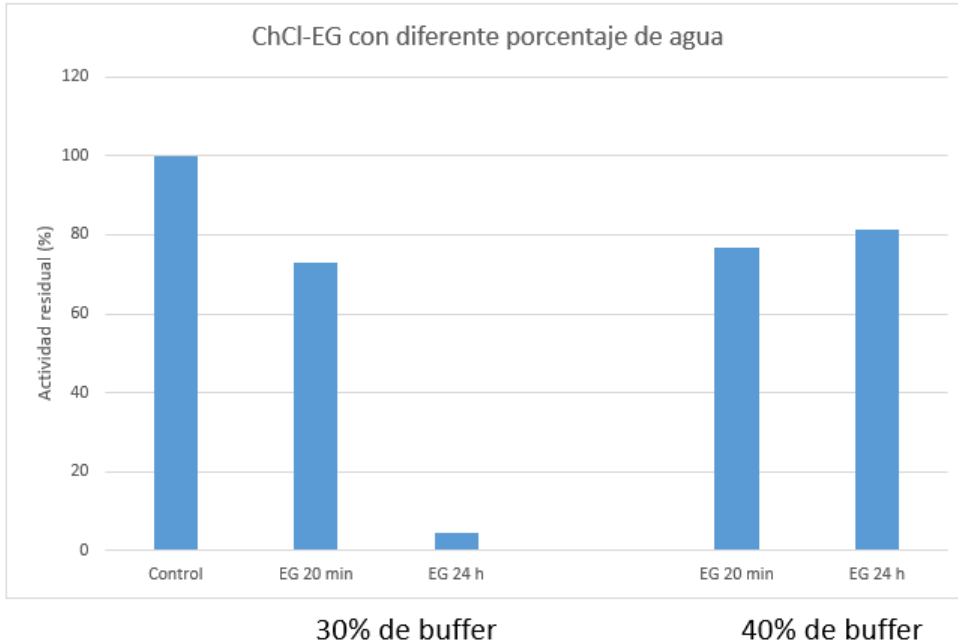


Figura. 14: Gráfica del porcentaje de actividad con relación a un aumento de porcentaje de agua. Reacciones de hidrólisis a 50 °C por 30 min en soluciones al 1% de sacarosa. Ensayo único sin reproducciones.

Para hacer más sencillo el proceso de reacción se descartaron los medios bifásicos, viscosos o más caros, sabiendo que el sistema ChCl – G mantiene la estabilidad enzimática, se eligió trabajar con esta mezcla, se realizó una comparación entre este sistema y un sistema de buffer para la hidrólisis de sacarosa a lo largo de 1 mes de almacenamiento a temperatura ambiente (Figura 15). Sin someter el sistema a temperaturas mayores de 25 °C, se observó que la inulinasa mantiene su actividad enzimática en el sistema DES, esto quiere decir que es estable en el tiempo, por un mes. Este comportamiento concuerda con lo reportado en trabajos anteriores sobre estabilidad enzimática en estos medios eutécticos, esta estabilidad se debe a su red de puentes de hidrógeno lo que permite la actividad enzimática (Taklimi *et al.*, 2023).



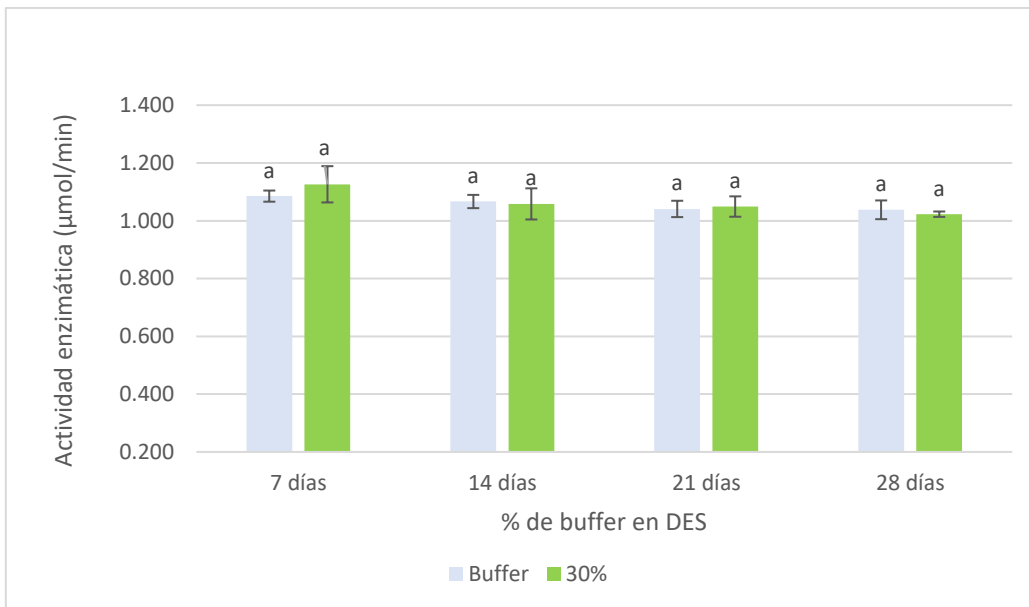
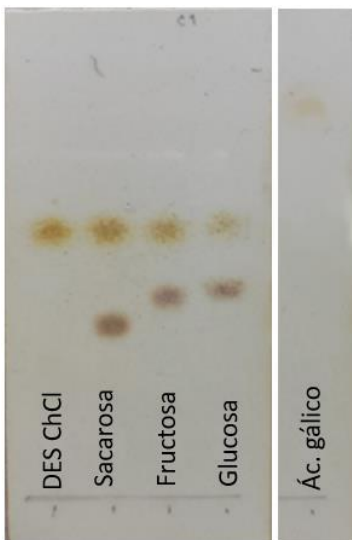


Figura. 15: Gráfica del porcentaje de actividad hidrolítica con relación al tiempo en un periodo de un mes. Reacciones de hidrólisis a 50 °C por 30 min en soluciones al 1% de sacarosa. Ensayo llevado por triplicado.

### Reacción enzimática y seguimiento por TLC.

Una vez comprobado que la enzima es estable y existen ventajas sobre los otros medios. En el DES ChCl-G se llevó a cabo la reacción como se menciona en la metodología y el posible producto se siguió por cromatografía de capa fina (TLC). Era necesario tener controles, para ello se realizó la cromatografía mostrada en la Figura 16 que muestra a los sustratos y la mezcla eutéctica con sus Rf sacarosa, fructosa, mezcla eutéctica, ácido gálico.

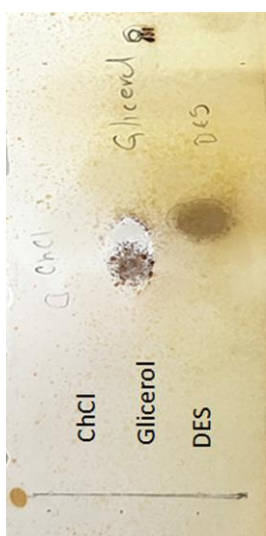




Compuesto	Rf
Sacarosa	0.6
Fructosa, Glucosa	0.625
ChCl-G (DES)	0.66
Ácido gálico	0.78

Figura. 16: TLC de controles. De izquierda a derecha: Sacarosa, fructosa, DES, ácido gálico, DES + sacarosa. Fase móvil butanol, metanol, agua, ácido acético en relación 3:2:0.7:0.3

Al tener 2 compuestos en el DES, se realizó la cromatografía de los componentes por separado y del DES. Para evaluar el comportamiento de la mezcla y descartar que el medio pueda confundir con algún producto o sustrato. En la Figura. 17 se aprecia que con la solución reveladora de orcinol no muestra al cloruro de colina, el glicerol sí, pero la combinación de ambos formando el DES, marcan un Rf distintivo, resultado probable de la red de puentes de hidrógeno formada (Pätzold *et al.*, 2019).



Compuesto	Rf
ChCl	0.45
Glicerol	0.52
DES	0.65

Figura. 17: TLC de controles. De izquierda a derecha: Cloruro de colina, glicerol y DES.





Teniendo los controles y medio elegido, se realizó la reacción en ambos sistemas buscando obtener fructooligosacáridos en DES, como lo indica la metodología se hizo una reacción con 10% de sacarosa en 1 mL y se comparó en las mismas condiciones con un medio acuoso convencional (Figura 18), donde claramente se aprecia la formación de FOS en el medio no convencional mientras que en el sistema buffer se observa principalmente hidrólisis, debido a que se favorece una vía de reacción sobre otra en cada caso.



Figura. 18: TLC de la reacción en sistema buffer y DES de izquierda a derecha. Condiciones 10% de sacarosa, 30 min a 50°C.

Una vez obtenido el producto se redujo la cantidad de agua para favorecer aún más la reacción de transglicosilación contra la hidrólisis, los resultados muestran que la ausencia de agua afecta radicalmente a la enzima reduciendo su actividad un 39% los primeros 30 minutos y hasta un 100% a las 24 horas (Figura 19). Sin embargo, añadiendo la enzima en un sistema de 10% agua, mantiene su actividad medida por hidrólisis. Con 20% y 30% no existe diferencia significativa con la actividad que tendría en un sistema 100% acuoso. Por otra parte, el problema en esta reacción al reducir el agua es la solubilidad de la sacarosa, que en el sistema parece ir de la mano, y al tener menos sustrato se obtienen menos productos como se observa en la TLC a diferentes porcentajes de buffer en el sistema.



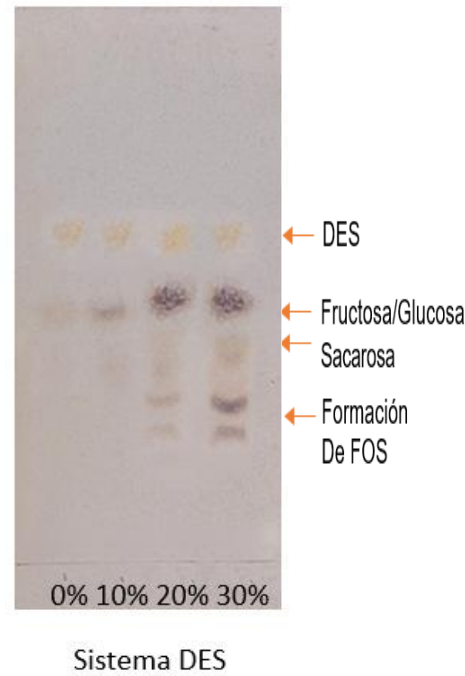
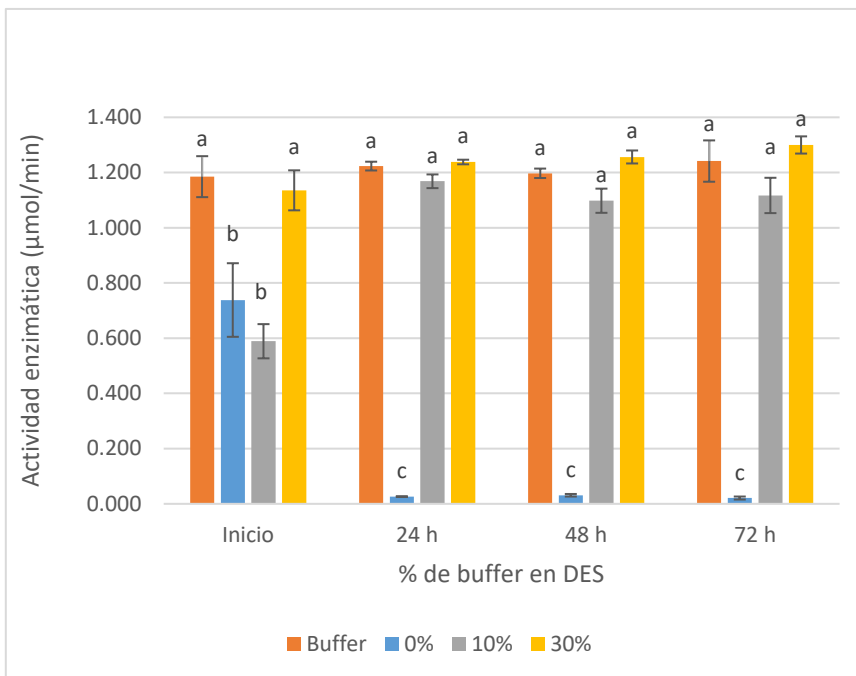


Figura. 19: Gráfica de la actividad hidrolítica con relación al tiempo y al porcentaje de buffer en el sistema en un periodo de 3 días y los productos de reacción a los diferentes porcentajes de buffer en el sistema DES. Reacciones de hidrólisis a 50 °C por 30 min en soluciones al 1% de sacarosa. Reacción para la TLC a 50 °C por 30 min en soluciones al 10% de sacarosa. Ensayo llevado por triplicado.

Para observar más claramente cómo afecta la concentración de sustrato, en los productos obtenidos se llevó una reacción con 1%, 5% y 10% de sacarosa en los 2 sistemas, sistema buffer pH 5 y el sistema DES de ChCl-G con 30% de buffer. Se obtuvieron las siguientes cromatografías (Figura 20) donde se aprecia la formación de FOS a partir de la concentración de 5% de sacarosa en el sistema DES, teniendo mejores resultados al trabajar con 10%. En el sistema buffer al trabajar con 1 y 5 por ciento los principales productos de reacción fueron fructosa y glucosa mientras que a 10% se aprecian FOS, pero en menor intensidad que en el sistema DES.





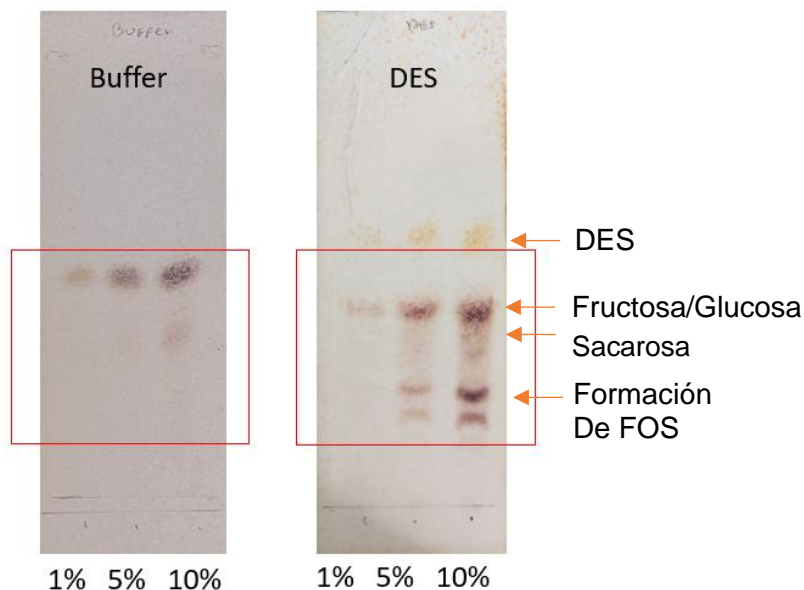


Figura. 20: TLC de la reacción en sistema buffer y DES de izquierda y derecha variando la concentración de sacarosa como sustrato en la reacción. A 50°C y 30 min de reacción.

Ahora bien, la reacción se lleva a cabo a 50 °C como indica la metodología por lo que se probó la estabilidad enzimática a esta temperatura en los sistemas buffer y DES nuevamente. En la Figura 21 se observa un cambio significativo en el comportamiento de ambos sistemas al ser incubados a 50 °C, siendo menos termoestable en el medio DES que en buffer de acetatos. A las 24 horas en el sistema DES la enzima perdió el 85% de su actividad inicial mientras que en buffer solo perdió el 17%. A la par, se realizaron cromatografías de reacciones a los diferentes tiempos de contacto de la enzima en los medios a 50 °C observándose una clara diferencia en la obtención de productos a las 24 horas, manteniendo en gran medida sacarosa sin reaccionar, pero aun produciendo FOS y fructosa. A las 30 horas ya casi en su totalidad se mantiene la sacarosa, existiendo una ligera actividad hidrolítica y transfructosilante, posiblemente la enzima pierde termoestabilidad en el sistema DES debido a un cambio estructural ocasionado por la nueva red de puentes de hidrógeno que son afectados por la temperatura.



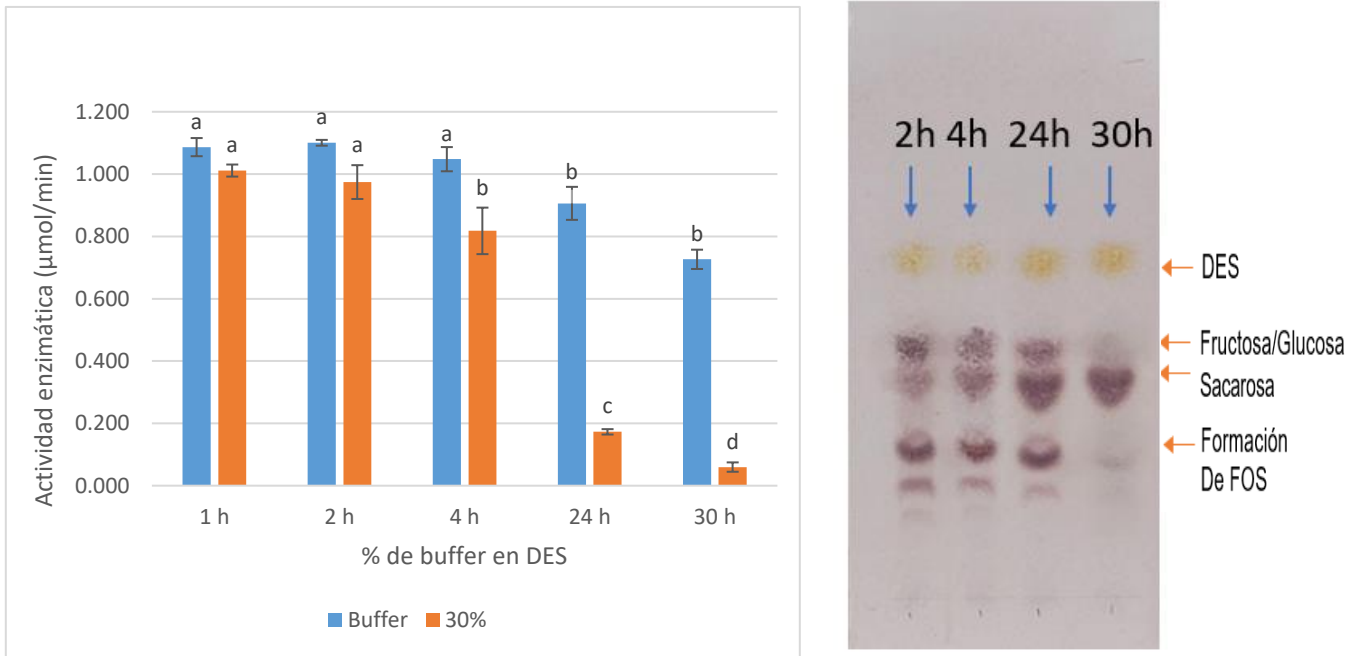


Figura. 21: Gráfica de la actividad hidrolítica con relación al tiempo y al porcentaje de buffer en un periodo de 30 horas a 50 °C y los productos de reacción en el sistema DES. Reacciones de hidrólisis a 50 °C por 30 min en soluciones al 1% de sacarosa. Reacción para la TLC a 50 °C por 30 min en soluciones al 10% de sacarosa. Ensayo llevado por triplicado.

### Reacción enzimática en DES

Para determinar si se trabajó en las mejores condiciones para este sistema, se llevaron a cabo reacciones variando parámetros de temperatura, cantidad de enzima en el sistema y tiempo de reacción.

En la figura 22 se aprecia que entre los 20 y 30 minutos de reacción no hay diferencia apreciable de los productos obtenidos por lo que se podría reducir el tiempo de reacción. La cantidad de enzima sí es significativa para el producto, pero podría reducirse y aumentarse el tiempo de reacción en 10 minutos para obtener un perfil similar de productos. En cuanto a la temperatura, 50 °C es la temperatura más alta donde se obtiene producto, sin embargo, en experimentos previos se determinó que a mayor tiempo en esta temperatura el sistema no es estable perdiendo actividad por lo cual podría reducirse a 40 °C para mantener la estabilidad y poder pensar en procesos continuos en un futuro.



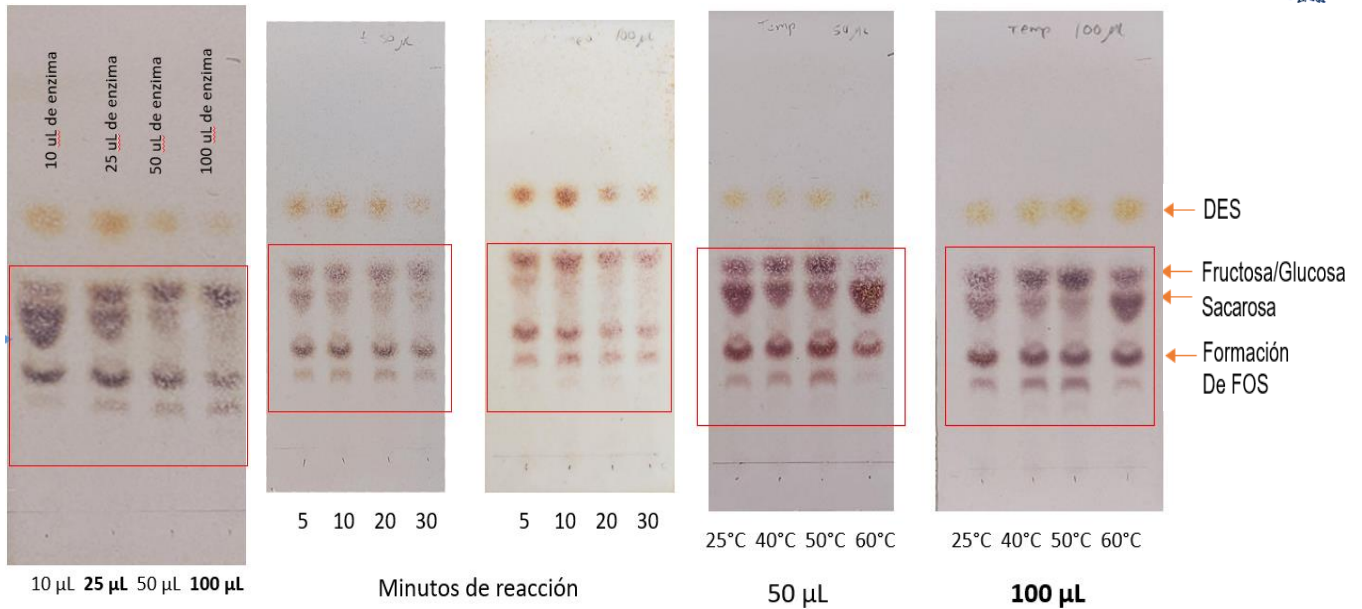


Figura. 22: TLC de la reacción en sistema DES de izquierda a derecha: variación de la cantidad de enzima, variación del tiempo de reacción, variación de la temperatura.

Para observar esta estabilidad a 40 °C, se repitió el experimento anterior sobre estabilidad durante 30 horas a 40 y 30 °C obteniendo los resultados de la Figura 23. Se aprecia que en esta temperatura la enzima es estable en ese lapso, lo que nos indica que sería mejor trabajar a 40 °C si se pensara en tiempos prolongados de reacción o en procesos continuos. Para observar si existe formación de FOS a 40 °C durante los diferentes tiempos de incubación, se realizó su TLC correspondiente con 10% de sacarosa.

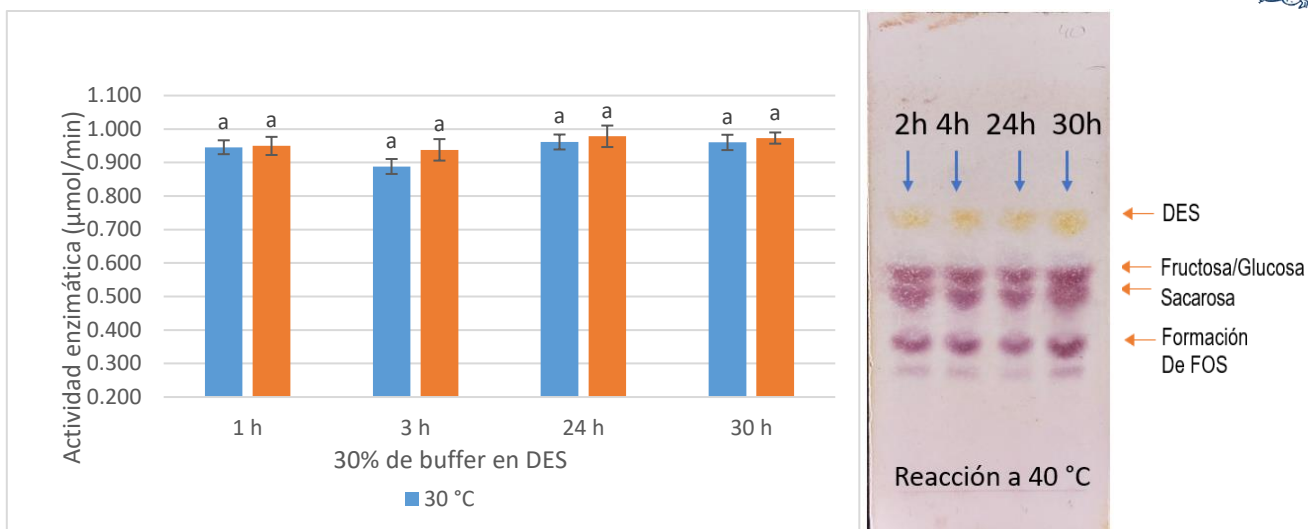


Fig. 23 Gráfica de la actividad hidrolítica con relación al tiempo y al porcentaje de buffer en un periodo de 30 horas a 30 y 40 °C y los productos de reacción en el sistema DES. Reacciones de hidrólisis a 30 y 40 °C por 30 min en soluciones al 1% de sacarosa. Reacción para la TLC a 40 °C por 30 min en soluciones al 10% de sacarosa. Ensayo llevado por triplicado.

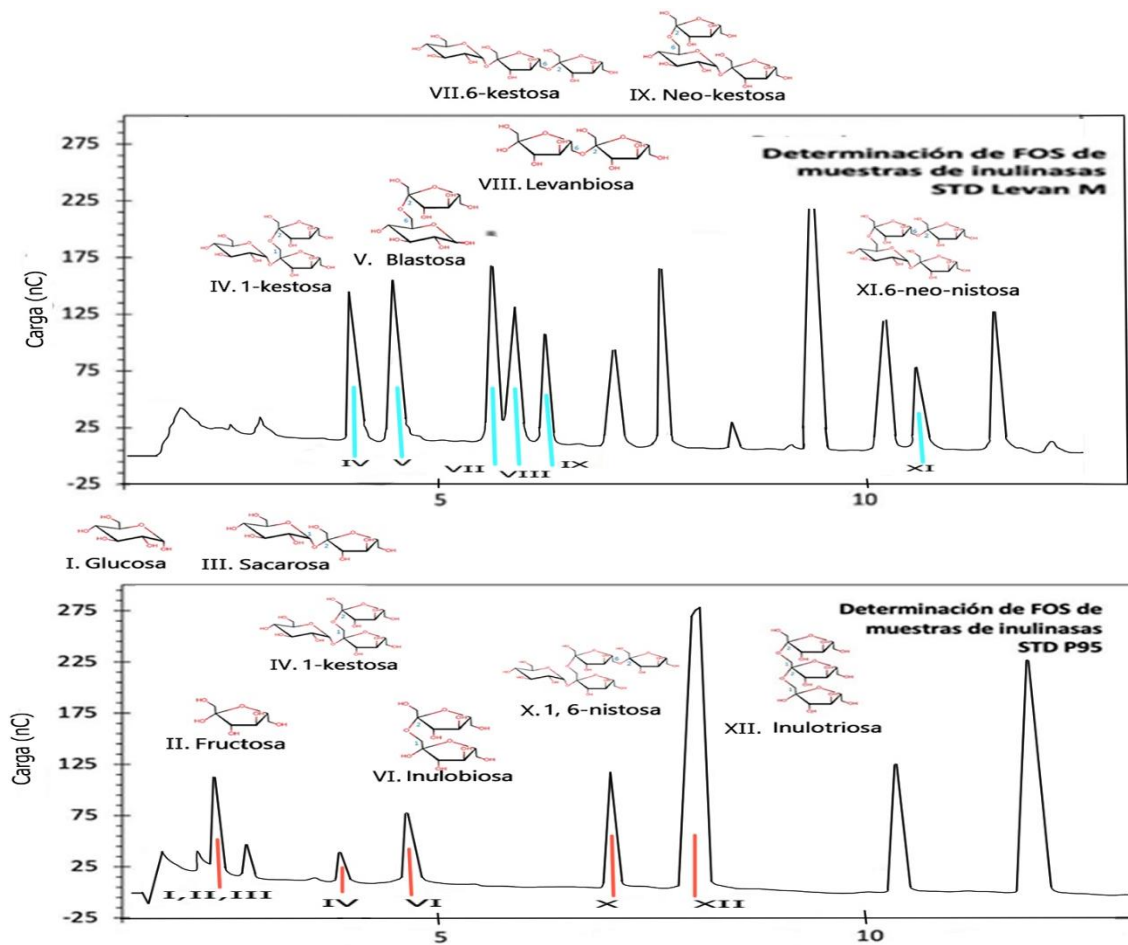
### Identificación del producto

Posteriormente para identificar qué tipo de FOS se están produciendo, el producto de reacción se concentró en solución acuosa, primero separando los componentes en una TLC preparativa para posteriormente rasparla, disolver los componentes separados, liofilizar la muestra y reconstituir en volúmenes más pequeños para su análisis por HPLC HPAEC-PAD. Se identificaron los productos de reacción a 30 minutos los cuales se muestran en la tabla 5 y el cromatograma en la figura 25. Se identificaron 6 tipos de oligosacáridos, 4 de 3 unidades de fructosa la 1-kestosa, 6-Kestosa, inulotriosa y neokestosa y 2 de 6 la 1,6-nistosa y la 6-neonistosa que varían por el tipo de enlace que presentan y se enlistan en la tabla 4. Se observan sus estructuras en la figura 24 y con esto se confirma la producción de FOS en mezclas eutécticas con bajas concentraciones de sacarosa.



Tabla 5. Sacáridos encontrados en la mezcla de reacción.

Número de unidades	Sacárido
1	Fructosa, Glucosa
2	Sacarosa, Blastosa, inulobiosa, levanbiosa
3	1-kestosa, 6-Kestosa, inulotriosa, neokestosa
4	1,6-nistosa, 6-neonistosa



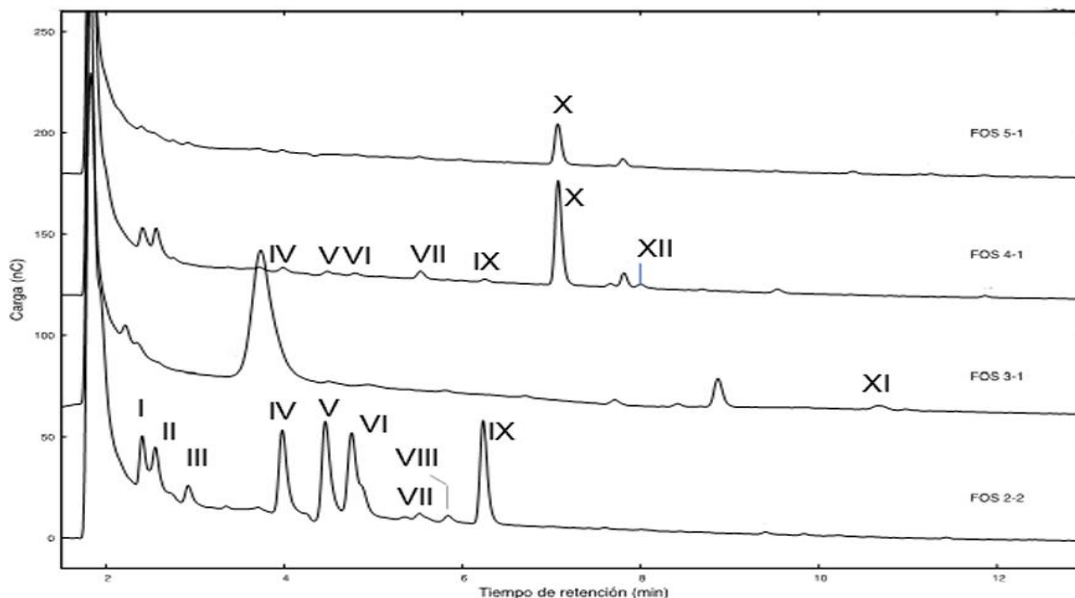


Figura. 24: Cromatograma obtenido de diferentes fracciones de una cromatografía preparativa I. glucosa, II. fructosa, III. sacarosa, IV. 1-kestosa, V. blastosa, VI. inulobiosa, VII. 6-kestosa, VIII. levanobiosa, IX. neokestosa, X. 1,6-nistosa, XI. 6-neo-nistosa, XII. Inulotriosa.

### Transglucosilación enzimática con polifenoles y alcoholes alifáticos.

Por otra parte, teniendo los antecedentes de reacciones de transglucosilación con enzimas hidrolasas, se llevaron reacciones con el fin de producir un glucósido que tuviera un aglicón por lo que se probaron polifenoles como ácido gálico, resveratrol o alcoholes lineales como butanol, heptanol y octanol bajo las condiciones mencionadas en la metodología. Los resultados fueron los siguientes.

Se realizó la TLC de la reacción en el medio DES, utilizando como control la mezcla de medio con los sustratos, sin enzima y por otro lado la mezcla de reacción a los 30 minutos. En la figura 25 se aprecia los diferentes compuestos que corrieron en la placa de sílica donde se destaca un nuevo compuesto producto de la reacción enzimática, el valor de R<sub>f</sub>, se ubica en la zona de FOS, sin embargo, llamó la atención que se tratara de un solo compuesto y no la característica banda de diversos compuestos presentes en los FOS.



Transglucosilación enzimática de la sacarosa por medio de diversos sustratos aceptores.

Resultados



Compuesto	Rf
Sacarosa	0.55
Fructosa	0.625
ChCl-G (DES)	0.66
Ácido gálico*	0.78
Desconocido	0.51

Figura. 25: TLC de la reacción en cloruro de colina glicerol. De izquierda a derecha: Mezcla de reacción diluida 1:2. Reacción diluida 1:2. Mezcla de reacción diluida 1:5. Reacción diluida 1:5.

Todas las reacciones llevadas a cabo tuvieron como molécula aceptora al ácido gálico para el intento de síntesis de un glicósido de este, que al tener compuestos no identificados es probable que se haya obtenido.

Para la determinación de si nuestro posible glucósido de ácido gálico era el nuevo compuesto se recurrió a ver las cromatografías en luz UV de onda corta sin embargo los resultados no eran contundentes, ya que el control tenía una pequeña banda en UV, para salir de dudas se recurrió a un revelado con una solución de  $\text{FeCl}_3$  al 1% donde los compuestos fenólicos reaccionan y toman un color apreciable. En la figura 26 se puede observar cómo se descarta la presencia de un compuesto fenólico y con ello se presume que los productos de reacción son solamente fructooligosacáridos que varían por el cambio de medio de reacción y la adición de ácido gálico.

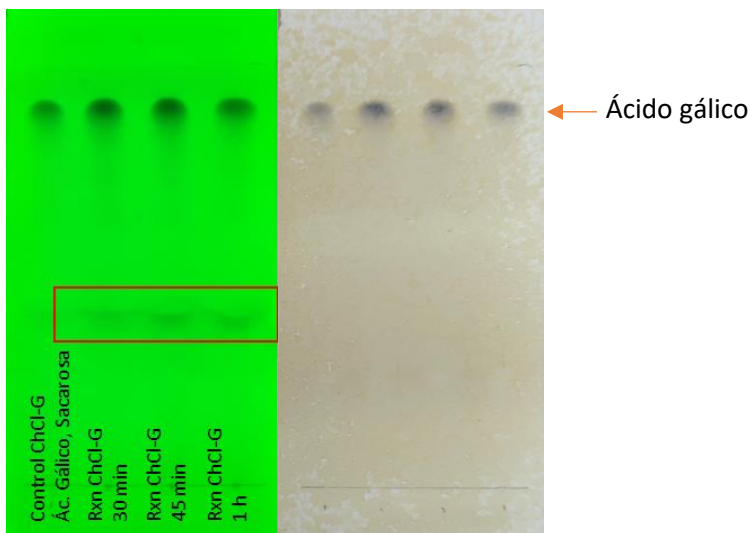


Figura. 26: TLC de la reacción con ácido gálico y sacarosa en cloruro de colina - glicerol. De izquierda a derecha: Control de la reacción, reacción a 30 minutos, reacción a 45 minutos y reacción a 60 minutos. Reveladas con luz UV y con  $FeCl_3$ .

Al observar que la banda formada no correspondía al glucósido buscado se realizó la misma reacción en DES aumentando un 50% la cantidad de enzima con el fin de observar si se producía un nuevo compuesto, a la par se realizó la reacción con resveratrol en las mismas condiciones. Los resultados en TLC mostraron nuevamente una banda en las diferentes reacciones como se observa en la figura 27 que posiblemente se trate de oligosacáridos de un mismo peso molecular, reforzado porque al quemar con la solución de  $FeCl_3$  sólo se marcaban las manchas correspondientes al ácido gálico y al resveratrol. En el caso del resveratrol, las bandas son más tenues posiblemente debido a una menor actividad enzimática.





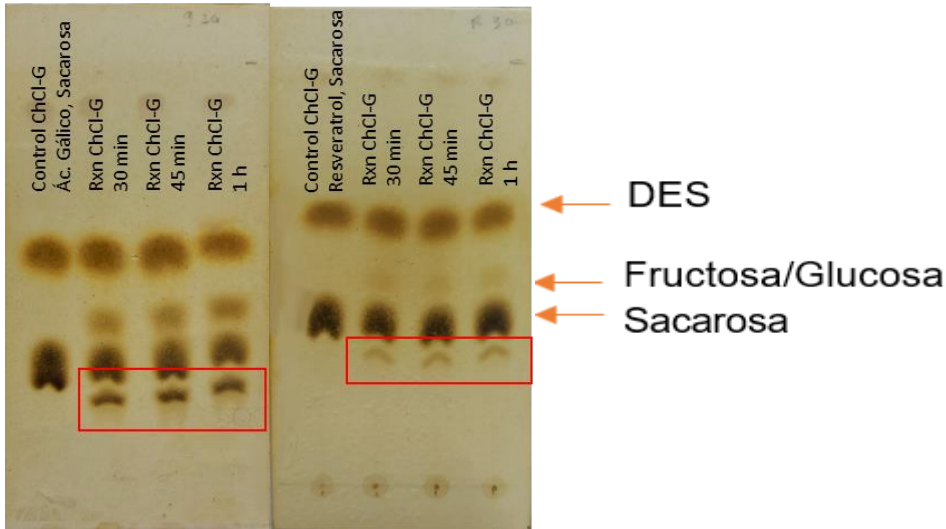


Figura. 27: TLC de la reacción con ácido gálico - sacarosa y resveratrol – sacarosa en cloruro de colina - glicerol. De izquierda a derecha: Control de la reacción, reacción a 30 minutos, reacción a 45 minutos y reacción a 60 minutos. Reveladas con solución de orcinol.

En un intento diferente, se aumentó la concentración del compuesto fenólico con el fin de probar si favorecía la formación del glucósido, este aumento fue del 100% y como se aprecia en la figura 28 el resultado fue contraproducente, llegando a casi desaparecer el producto formado inicialmente en reacciones anteriores. De igual manera no se aprecia producción de fructosa y glucosa lo que indica que la enzima también pierde su actividad hidrolítica.

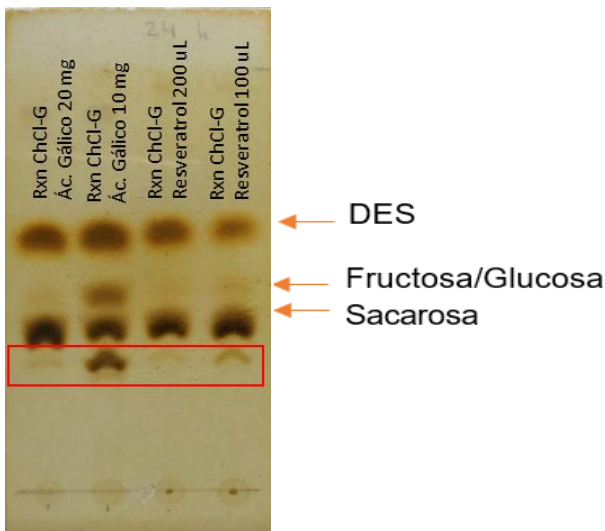


Figura. 28: TLC de la reacción con ácido gálico - sacarosa y resveratrol – sacarosa en cloruro de colina - glicerol. De izquierda a derecha: Reacción con 20 mg de ácido gálico, Reacción con 10 mg de ácido gálico, Reacción con 20 µg de resveratrol, Reacción con 10 µg de resveratrol.





En los experimentos para síntesis enzimática del glucósido, con los resultados observados anteriormente, se pensó que el ácido gálico inhibe la actividad enzimática de la inulinasa. Para probar este punto se realizaron reacciones con DNS para poder monitorear la reacción a diferentes concentraciones del polifenol. Los resultados se muestran en la figura 29 donde se comprueba lo predicho, a los 30 minutos con diferentes concentraciones de ácido gálico presente en la reacción, la actividad de la enzima cae. Con 20 mg la actividad de la enzima solo es un 9% de la actividad en medio acuoso. Por lo que se presume que además de no poder fungir como sustrato en la reacción, el ácido gálico es un inhibidor de la enzima inulinasa. Esto concuerda con lo encontrado en literatura donde se ha estudiado el rol de inhibición de compuestos fenólicos en enzimas hidrolasas debido principalmente a la presencia de interacciones enzima – compuesto fenólico como la mencionan (Stamogiannou *et al.*, 2021).

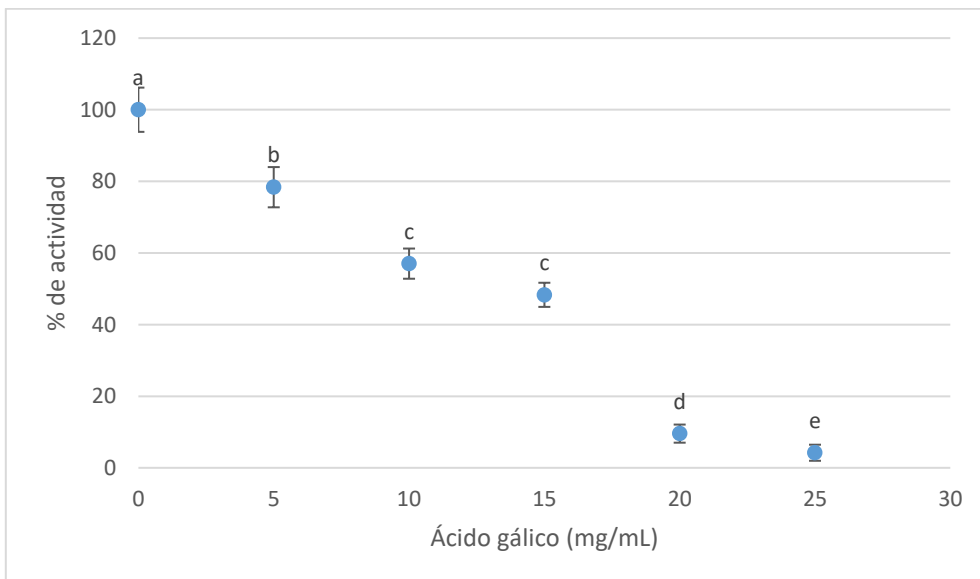


Figura. 29: Gráfica del porcentaje de actividad hidrolítica de la enzima inulinasa en ChCl-G con 30% de agua a diferentes concentraciones de ácido gálico reacción a 50°C por 30 minutos. Experimento realizado por triplicado.

En otro intento de sintetizar un glucósido, se añadieron alcoholes para la producción de alquil glucósidos cuyos resultados se muestran en la figura 30.



Sorprendentemente la reacción llevó a una gran producción de fructooligosacáridos sin embargo no al alquil glucósido.

Una vez descartada la formación de glucósidos, se puede decir que la enzima es selectiva al realizar transfructosilación con la sacarosa y sus derivados formando únicamente fructooligosacáridos. Las reacciones para la producción de FOS tuvieron mejores resultados con una fase orgánica y el DES, llegando a tener bandas mejor pronunciadas al aprovechar las propiedades de un medio bifásico en la producción de glicósidos como menciona (Karboune *et al.*, 2018). En la figura 30, se observa este patrón de fructooligosacáridos producidos en mezclas eutécticas como solvente principal donde es mejor que en medio acuoso excepto en el medio que se le agregó butanol que al parecer daña a la enzima.

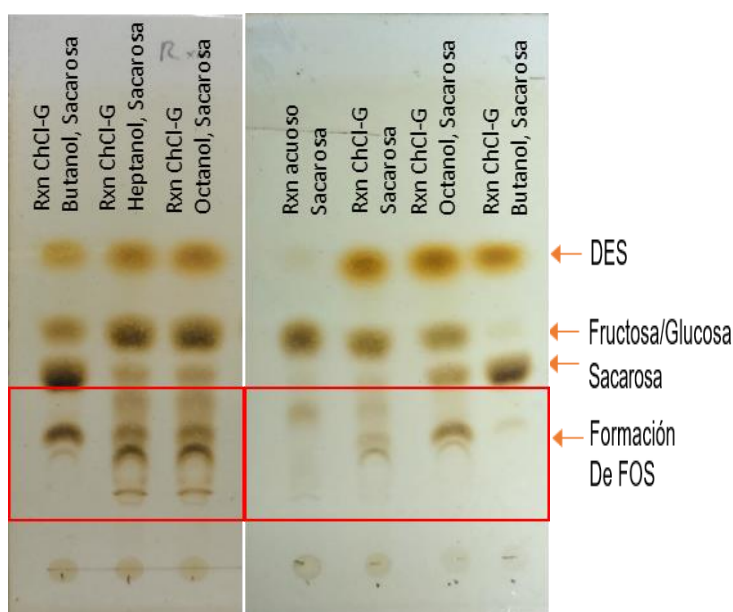


Figura. 30: A) TLC de la reacción sacarosa y diferentes alcoholes en cloruro de colina – glicerol. De izquierda a derecha: Reacción con 30% butanol, Reacción con 30% heptanol, Reacción con 30% octanol. B) de izquierda a derecha: Reacción en medio acuoso, Reacción con DES.



## Simulación *in silico*

La simulación de dinámica molecular se llevó a cabo en el programa GROMACS definiendo una caja de  $100 \text{ nm}^3$  con 2 condiciones para los medios del sistema, uno con moléculas de agua y otro con el 30% de moléculas de agua y 70% de moléculas correspondientes al medio eutéctico cloruro de colina – glicerol en relación 1:2. El sistema se muestra en la figura 31.

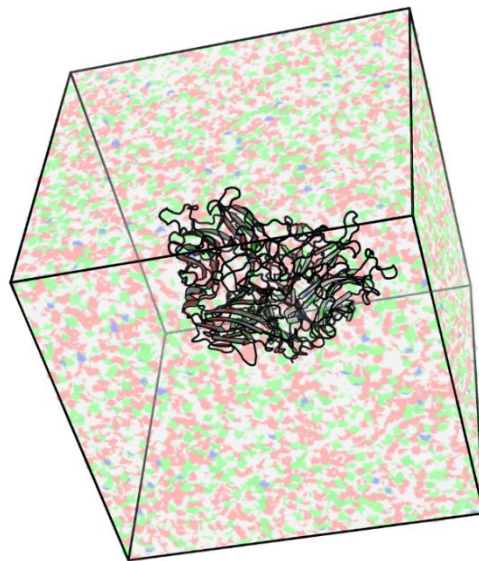


Figura. 31: Ejemplo del sistema montado en GROMACS para la dinámica molecular de la enzima en el medio eutéctico coluro de colina-glicerol con 30 % de agua.

En la figura 32 se observó que en el sistema DES existen menos fluctuaciones en de la desviación de la media cuadrática (RMSD, por sus siglas en inglés) de los átomos que componen al esqueleto de la proteína a lo largo de la trayectoria comparado con el sistema acuoso, en DES desde aproximadamente los 300 ns se llega a una estabilidad en la movilidad de la enzima. En el sistema acuoso se aprecia un punto de estabilidad después de los 800 ns de trayectoria en la simulación. Estas diferencias nos indican que el medio eutéctico lleva a una estabilización de la proteína más rápida, probablemente debido a las interacciones con la superficie de esta.



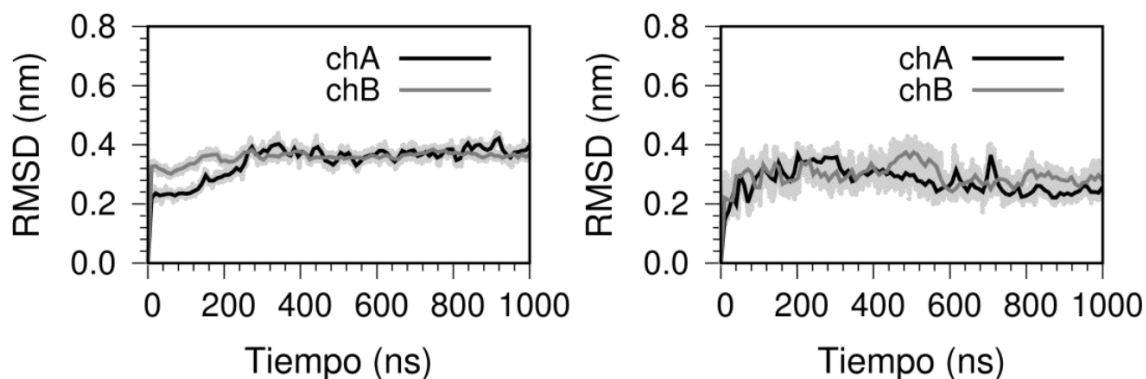


Figura. 32: RMSD de la enzima en un lapso de 1000 ns obtenido por dinámica molecular en GROMACS.

En la figura 33 se puede observar que la movilidad de ciertas zonas de la enzima es restringida en el medio eutéctico, por ejemplo, los residuos cercanos al residuo 255 tienen cerca de 10 Å en la movilidad en el medio acuoso mientras que en el sistema DES se llega aproximadamente a 3.6 Å, teniendo un cambio claro en esta libertad en los diferentes medios. Otro caso de este cambio se ve en los extremos de la proteína amino y carboxilo en los cuales de igual manera se ven reducidos los valores de fluctuación de la media cuadrática (RMSF, por sus siglas en inglés) para el medio eutéctico.

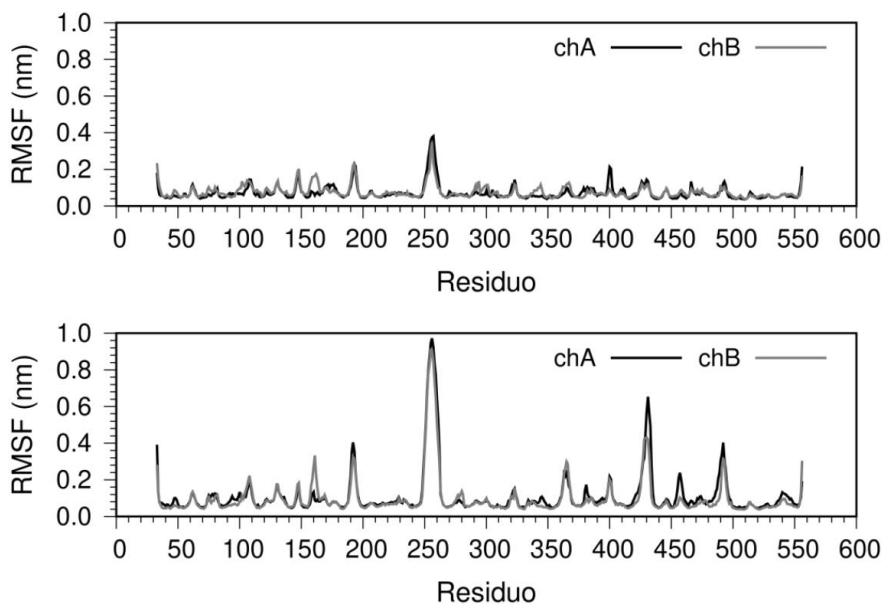


Figura. 33: RMSF de la enzima por residuos en los diferentes sistemas eutéctico y acuoso.





Para complementar la figura 34, en la figura 38 se observa la diferencia entre los sistemas donde es más clara la diferencia de movilidad de los residuos cercanos al residuo 255. Existen diversos picos negativos que indican zonas donde existió mayor movilidad en el medio acuoso que en el medio eutéctico.

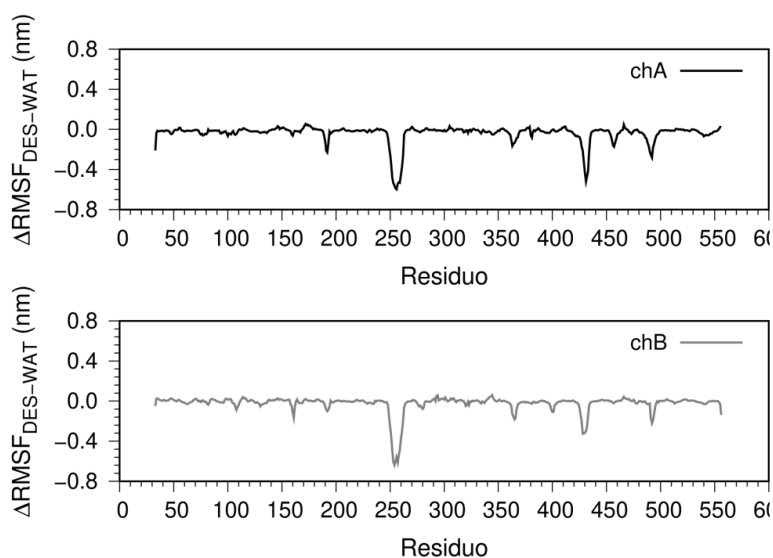


Figura. 34. Diferencia de los movimientos por residuo entre el sistema eutéctico menos el sistema acuoso en las 2 cadenas de la enzima.

En la figura 35 se tienen 2 casos interesantes, por un lado, los números de contactos entre las cadenas de la enzima parecen fluctuar mucho en el caso del medio acuoso comparado con el sistema eutéctico. Se puede observar que aproximadamente a los 760 ns el número de contactos en cada caso se asemeja, posteriormente esta similitud se mantiene, sin embargo, en términos de fluctuación para llegar a esta estabilización en el DES fue más rápida al estar en esos valores desde los primeros ns mientras que en el medio acuoso se presentó una disminución a lo largo de la trayectoria lo que nos habla de una estabilización más lenta.



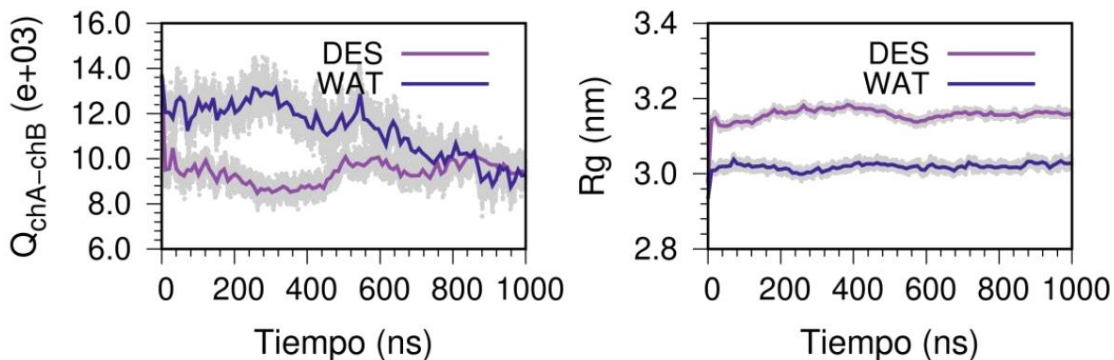


Figura. 35: Número de contactos entre las cadenas de la enzima a lo largo de la trayectoria de 1000 ns corrida en GROMACS. Radio de giro de la proteína en los diferentes medios acuoso y eutéctico por 1000 ns.

En el caso del radio de giro existe una diferencia entre los 2 sistemas lo que se le puede atribuir a las interacciones de los residuos de la superficie de la enzima con el medio teniendo posiblemente más libertad a expandirse en el medio DES que en el medio acuoso donde la cantidad de moléculas de agua rodean en mayor proporción a la proteína haciéndola más compacta.

La estabilidad en el sistema DES, parece llegar con más rapidez, probablemente por la red de puentes de hidrógeno que rodean a la proteína y generan menos movilidad. Los residuos donde esto se observa más corresponden a un loop exterior, experimentalmente pareciera no tener mucha importancia en la actividad enzimática al no existir grandes cambios en los 2 sistemas en cuanto actividad enzimática.

Para realizar transglucosilaciones en el medio DES, sí se favorece la reacción seguramente al permitir mejor disponibilidad del sustrato y evitar la hidrólisis, con los resultados se puede decir que la enzima es estable en el medio eutéctico, alcanza esta estabilidad rápidamente y la mantiene para llevar a cabo la reacción.





## Conclusiones

Las inulinasas presentes en la mezcla comercial Novozym® 960, mantienen actividad enzimática hidrolasa en mezclas eutécticas tales como cloruro de colina – glicerol y cloruro de colina – propilenglicol en una relación molar 1:2, con un 30% de buffer, hasta por un mes reduciendo su actividad sólo un 17.5% lo que demuestra su estabilidad en estos medios.

Añadiendo un 10% de agua como cosolvente, la enzima inulinasasa recupera su estabilidad en DES con la mezcla eutéctica cloruro de colina - glicerol, alcanzando una actividad de 95.5% a los 7 días de exposición. En el caso del cloruro de colina – etilenglicol, con un 40% de agua, la enzima alcanza un 81% de su actividad. Sin embargo, este ya representa un medio acuoso en el que se pierde la mezcla eutéctica.

Se concluye que el ácido gálico es un inhibidor de la enzima inulinasasa, estando en el medio de reacción, una concentración de 20 mg/mL disminuye hasta un 91% la actividad hidrolítica.

En sistemas bifásicos con diversos alcoholes lineales no se presenta reacción de transglicosilación por parte de la enzima inulinasasa sin embargo pareciera mejorar la producción de fructooligosacáridos esto al desfavorecer la reacción de hidrólisis.

La producción de FOS aparente por seguimiento en TLC es mejor, en la mezcla eutéctica cloruro de colina – glicerol, que en medio acuoso a concentraciones bajas de sacarosa (5% y 10%).

La producción de fructooligosacáridos por seguimiento en TLC y confirmado por HPLC HPAEC-PAD es factible en la mezcla eutéctica cloruro de colina – glicerol en proporción 1:2 a concentraciones bajas de sacarosa (10%).

Los productos obtenidos en la reacción de transfructosilación en la mezcla eutéctica fueron los siguientes, por longitud de cadena: monosacáridos: Fructosa y glucosa. Disacáridos: Sacarosa, blastosa, inulobiosa, levanobiosa. Trisacáridos: 1-kestosa, 6-kestosa, inulotriosa, neokestosa. Tetrasacáridos: 1,6-nistosa y 6-neonistosa.







## Perspectivas

Teniendo la factibilidad de la reacción de trasglucosilación en mezclas eutécticas y sus condiciones, se esperaría diseñar un proceso de separación práctico para los FOS.

Purificar las enzimas endo y exo-inulinasas de la mezcla de Novo 960 y con las condiciones establecidas, llevar a cabo las reacciones de transglucosidación con la exo-inulinasas que es la enzima que se encuentra en mayor proporción.

Determinar la estabilidad de la enzima pura en el DES y descartar los posibles efectos de los estabilizantes de la mezcla comercial.

Cuantificar los FOS así como la eficiencia de la reacción de transfructosilación.





## Bibliografía

- ≤ali, A. (1995). Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *Molecular Medicine Today*, 1(6), 270–277. [https://doi.org/10.1016/S1357-4310\(95\)91170-7](https://doi.org/10.1016/S1357-4310(95)91170-7)
- Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., & Lindahl, E. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1–2, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
- Aguilera, C., Mateos, J., Díaz, L., de Prato, A., Peralta, J., Hernández, Á., Gómez, S., Gross, M., Lorenzo, F., Guarner, F., Marcos, A., Augustin, O., Nova, E., Alonso, B., Amat, P., Ramos, E., Romeo, J., Tobal, F., Vidal, D., ... Zurita, A. (2008). Alimentos funcionales: Aproximación a una nueva alimentación. *Dirección General de Salud Pública y Alimentación*, 53(9), 287. <http://www.madrid.org/bvirtual/BVCM009703.pdf>
- Álvaro-Benito, M., Sainz-Polo, M. A., González-Pérez, D., González, B., Plou, F. J., Fernández-Lobato, M., & Sanz-Aparicio, J. (2012). Structural and kinetic insights reveal that the amino acid pair Gln-228/Asn-254 modulates the transfructosylating specificity of *Schwanniomyces occidentalis*  $\beta$ -fructofuranosidase, an enzyme that produces prebiotics. *Journal of Biological Chemistry*, 287(23), 19674–19686. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.355503>
- Berman, H. M. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Casa, M. (2018). Caracterización de glicosidasas y permeasas fúngicas implicadas en el transporte y metabolismo de azúcares. *Universitat Politècnica de València*. <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1120700020921110%0Ahttps://doi.org/10.1016/j.reuma.2018.06.001%0Ahttps://doi.org/10.1016/j.arth.2018.03.044%0Ahttps://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1063458420300078?token=C039B8B13922A2079230DC9AF11A333E295FCD8>
- Chi, Z., Chi, Z., Zhang, T., Liu, G., & Yue, L. (2009). Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(2), 211–220. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1827-1>
- Davies, G., & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3(9), 853–859. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00220-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00220-9)
- Dirks-Hofmeister, M. E., Verhaeghe, T., De Winter, K., & Desmet, T. (2015). Creating Space for Large Acceptors: Rational Biocatalyst Design for Resveratrol Glycosylation in an Aqueous System. *Angewandte Chemie*, 127(32), 9421–9424. <https://doi.org/10.1002/ange.201503605>





- Farzad, R., Kuhn, D. D., Smith, S. A., O'Keefe, S. F., Hines, I. S., Bushman, T. J., Galagarza, O. A., & Stevens, A. M. (2021). Effects of selenium-enriched prebiotic on the growth performance, innate immune response, oxidative enzyme activity and microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 531(August 2019). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735980>
- Fernandes, P. (2014). Marine enzymes and food industry: Insight on existing and potential interactions. *Frontiers in Marine Science*, 1(OCT), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmars.2014.00046>
- Ferreira, A. S. D., Craveiro, R., Duarte, A. R., Barreiros, S., Cabrita, E. J., & Paiva, A. (2021). Effect of water on the structure and dynamics of choline chloride/glycerol eutectic systems. *Journal of Molecular Liquids*, 342, 117463. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117463>
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125(6), 1401–1412. <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>
- Hansen, B. B., Spittle, S., Chen, B., Poe, D., Zhang, Y., Klein, J. M., Horton, A., Adhikari, L., Zelovich, T., Doherty, B. W., Gurkan, B., Maginn, E. J., Ragauskas, A., Dadmun, M., Zawodzinski, T. A., Baker, G. A., Tuckerman, M. E., Savinell, R. F., & Sangoro, J. R. (2021). Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. *Chemical Reviews*, 121(3), 1232–1285. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00385>
- Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C., & Fraaije, J. G. E. M. (1997). LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 18(12), 1463–1472. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199709\)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H)
- Hollá, V., Karkeszová, K., Antošová, M., & Polakovič, M. (2021). Transglycosylation properties of a *Kluyveromyces lactis* enzyme preparation: Production of tyrosol  $\beta$ -fructoside using free and immobilized enzyme. *Process Biochemistry*, 110(May), 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.08.016>
- Huang, J., & Jr, A. D. M. (2013). CHARMM36 All-Atom Additive Protein Force Field: Validation Based on Comparison to NMR Data. *Journal of Computational Chemistry*, 34(25), 2135–2145. <https://doi.org/10.1002/jcc.23354>
- Itoh, T., Matsushita, Y., Abe, Y., Han, S. H., Wada, S., Hayase, S., Kawatsura, M., Takai, S., Morimoto, M., & Hirose, Y. (2006). Increased enantioselectivity and remarkable acceleration of lipase-catalyzed transesterification by using an imidazolium PEG-Alkyl sulfate ionic liquid. *Chemistry - A European Journal*, 12(36), 9228–9237. <https://doi.org/10.1002/chem.200601043>
- Karboune, S., Appanah, N., Khodaei, N., & Tian, F. (2018). Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides from sucrose by endo-inulinase-catalyzed transfructosylation reaction in biphasic systems. *Process Biochemistry*, 69, 82–





91. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.03.010>
- Kaur, S., Gupta, A., Kashyap, H. K., & Kashyap, H. K. (2020). How Hydration Affects the Microscopic Structural Morphology in a Deep Eutectic Solvent. *Journal of Physical Chemistry B*, 124(11), 2230–2237. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b11753>
- Kim, J., Clark, D. S., & Dordick, J. S. (2000). Intrinsic effects of solvent polarity on enzymic activation energies. *Biotechnology and Bioengineering*, 67(1), 112–116. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000105\)67:1<112::AID-BIT13>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000105)67:1<112::AID-BIT13>3.0.CO;2-E)
- Kleiner, B., & Schorken, U. (2014). Native lipase dissolved in hydrophilic green solvents: A versatile 2-phase reaction system for high yield ester synthesis. *Eur. J. Lipid. Sci.*, 167–177.
- Koshland Jr., D. E. (1953). Koshland - original. *Biol. Rev.*, 28(February), 416–436.
- Kuhn, G. de O., Silva, M. F., Mulinari, J., Golunski, S., Dallago, R. M., Dalla Rosa, C., Valério, A., Oliveira, D. de, Oliveira, J. V., Mossi, A. J., & Treichel, H. (2016). *Aspergillus niger* inulinase immobilized in polyurethane foam and treated in pressurized LPG: A potential catalyst for enzymatic synthesis of fructooligosaccharides. *Biocatalysis and Biotransformation*, 34(6), 291–294. <https://doi.org/10.1080/10242422.2016.1247826>
- Kutlu, N., Yilmaz, M. S., Erdem, G. M., Sakiyan, O., & Isci, A. (2022). Effects of Molar Ratio, Frequency, Water Content and Temperature on Dielectric Properties of Deep Eutectic Solvents. *Latin American Applied Research*, 52(1), 27–33. <https://doi.org/10.52292/j.laar.2022.725>
- Lee, B. (2017). Extremophilic Carbohydrate Active Enzymes (CAZymes). *Journal of Nutritional Health & Food Engineering*, 7(1). <https://doi.org/10.15406/jnhfe.2017.07.00230>
- Lira-León, G. (2021). *PRODUCCIÓN DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS (FOS) CATALIZADA POR LA EXOINULINASA DE Kluyveromyces marxianus AZ8*.
- Mangas-Sánchez, J., & Adlercreutz, P. (2015). Enzymatic preparation of oligosaccharides by transglycosylation: A comparative study of glucosidases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 122, 51–55. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.08.014>
- Martins, G. N., Ureta, M. M., Tymczynszyn, E. E., Castilho, P. C., & Gomez-Zavaglia, A. (2019). Technological aspects of the production of fructo and galacto-oligosaccharides. Enzymatic synthesis and hydrolysis. In *Frontiers in Nutrition* (Vol. 6). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00078>
- Mbous, Y. P., Hayyan, M., Hayyan, A., Wong, W. F., Hashim, M. A., & Looi, C. Y. (2017). Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering—Promises and challenges. *Biotechnology Advances*, 35(2), 105–134. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.006>





- McCarter, J. D., & Withers, S. G. (1994). McCarter and Withers 1994.pdf. *Current Opinion in Structural Biology*, 4, 885–892.
- Miranda-Molina, A., Xolalpa, W., Strompen, S., Arreola-Barroso, R., Olvera, L., López-Munguía, A., Castillo, E., & Saab-Rincon, G. (2019). Deep eutectic solvents as new reaction media to produce alkyl-glycosides using alpha-amylase from *Thermotoga maritima*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21). <https://doi.org/10.3390/ijms20215439>
- Monhemi, H., Housaindokht, M. R., Moosavi-Movahedi, A. A., & Bozorgmehr, M. R. (2014). How a protein can remain stable in a solvent with high content of urea: Insights from molecular dynamics simulation of *Candida antarctica* lipase B in urea: Choline chloride deep eutectic solvent. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(28), 14882–14893. <https://doi.org/10.1039/c4cp00503a>
- Morelos-López, M. (2020). *INMOVILIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA INULINASA 960 DE NOVOZYME COMO BIOCATALIZADOR PARA LA HIDRÓLISIS DE INULINA*.
- Nemukula, A., Mutanda, T., Wilhelmi, B. S., & Whiteley, C. G. (2009). Response surface methodology: Synthesis of short chain fructooligosaccharides with a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. *Bioresource Technology*, 100(6), 2040–2045. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.10.022>
- Niba, A. T., Beal, J. D., Kudi, A. C., & Brooks, P. H. (2009). Bacterial fermentation in the gastrointestinal tract of non-ruminants: Influence of fermented feeds and fermentable carbohydrates. *Tropical Animal Health and Production*, 41(7), 1393–1407. <https://doi.org/10.1007/s11250-009-9327-6>
- Ortiz, L. T., Rebolé, A., Velasco, S., Rodríguez, M. L., Treviño, J., Tejedor, J. L., & Alzueta, C. (2013). Effects of inulin and fructooligosaccharides on growth performance, body chemical composition and intestinal microbiota of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition*, 19(4), 475–482. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2012.00981.x>
- Pätzold, M., Siebenhaller, S., Kara, S., Liese, A., Sylđatk, C., & Holtmann, D. (2019). Deep Eutectic Solvents as Efficient Solvents in Biocatalysis. *Trends in Biotechnology*, 37(9), 943–959. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.03.007>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612.
- Pogorevc, M., Stecher, H., & Faber, K. (2002). A caveat for the use of log P values for the assessment of the biocompatibility of organic solvents. *Biotechnology Letters*, 24(11), 857–860. <https://doi.org/10.1023/A:1015598523282>
- Pouyez, J., Mayard, A., Vandamme, A. M., Roussel, G., Perpète, E. A., Wouters, J., Housen, I., & Michaux, C. (2012). 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(11), 2423–2430. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.06.020>
- Ricca, E., Calabrò, V., Curcio, S., & Iorio, G. (2007). The state of the art in the production of fructose from inulin enzymatic hydrolysis. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27(3), 129–145. <https://doi.org/10.1080/07388550701503477>
- Risso, F. V. A., Mazutti, M. A., Treichel, H., Costa, F., Maugeri, F., & Rodrigues, M. I. (2012). Comparison Between Systems for Synthesis of Fructooligosaccharides from Sucrose Using Free Inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. *Food and Bioprocess Technology*, 5(1), 331–337. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0272-1>
- Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N., & Prapulla, S. G. (2005). Recent trends in the microbial production, analysis and application of Fructooligosaccharides. *Trends in Food Science and Technology*, 16(10), 442–457. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.05.003>
- Santos, A. M. P., & Maugeri, F. (2007). Synthesis of fructooligosaccharides from sucrose using inulinase from *Kluyveromyces marxianus*. *Food Technology and Biotechnology*, 45(2), 181–186.
- Schrödinger, L. (2022). *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5.4* Schrödinger, LLC.
- Silva, M. F., Rigo, D., Mossi, V., Golunski, S., De Oliveira Kuhn, G., Di Luccio, M., Dallago, R., De Oliveira, D., Oliveira, J. V., & Treichel, H. (2013). Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides by inulinases from *Aspergillus niger* and *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 in aqueous-organic medium. *Food Chemistry*, 138(1), 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.118>
- Singh, R. S., Singh, T., & Kennedy, J. F. (2020). Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides from inulin in a batch system. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 1(October), 100009. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2020.100009>
- Stamogiannou, I., Van Camp, J., Smagghe, G., Van de Walle, D., Dewettinck, K., & Raes, K. (2021). Impact of phenolic compound as activators or inhibitors on the enzymatic hydrolysis of cellulose. *International Journal of Biological Macromolecules*, 186(July), 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.052>
- Uhoraningoga, A., Kinsella, G. K., Henehan, G. T., & Ryan, B. J. (2021).  $\beta$ -glucosidase from *Streptomyces griseus*: Ester hydrolysis and alkyl glucoside synthesis in the presence of Deep Eutectic Solvents. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 4(April), 100129. <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2021.100129>
- Vandamme, E. J., & Derycke, D. G. (1983). Microbial Inulinases: Fermentation Process, Properties, and Applications. In *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 29, Issue C). [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70356-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70356-3)





- Wagle, D. V., Deakyne, C. A., & Baker, G. A. (2016). Quantum Chemical Insight into the Interactions and Thermodynamics Present in Choline Chloride Based Deep Eutectic Solvents. *Journal of Physical Chemistry B*, 120(27), 6739–6746. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b04750>
- Weng, L., & Toner, M. (2018). Janus-faced role of water in defining nanostructure of choline chloride/glycerol deep eutectic solvent. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 20(35), 22455–22462. <https://doi.org/10.1039/C8CP03882A>
- Williams, T., & Kelley, C. (2016). *Gnuplot: an interactive plotting program*.
- Xu, W. J., Huang, Y. K., Li, F., Wang, D. D., Yin, M. N., Wang, M., & Xia, Z. N. (2018). Improving B-glucosidase biocatalysis with deep eutectic solvents based on choline chloride. *Biochemical Engineering Journal*, 138, 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.07.002>
- Zhao, H., Baker, G. A., & Holmes, S. (2011). Protease activation in glycerol-based deep eutectic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 72(3–4), 163–167. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.05.015>
- Zhao, H., Song, Z., & Olubajo, O. (2010). High transesterification activities of immobilized proteases in new ether-functionalized ionic liquids. *Biotechnology Letters*, 32(8), 1109–1116. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0262-4>
- Zhekenov, T., Toksanbayev, N., Kazakbayeva, Z., Shah, D., & Mjalli, F. S. (2017). Formation of type III Deep Eutectic Solvents and effect of water on their intermolecular interactions. *Fluid Phase Equilibria*, 441, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2017.01.022>

