



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y  
DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO A.C.

**PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE  
UNA  $\beta$ -FRUCTOFURANOSIDASA CON ACTIVIDAD  
FRUCTOSILTRANSFERASA PRODUCIDA POR LA  
LEVADURA *Torulaspota delbrueckii***

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
Maestro en Ciencia y Tecnología en la Especialidad de Biotecnología  
Productiva**

**PRESENTA:**

**IBT RAYMUNDO TRUJILLO GARCÍA**

**DIRECTOR: Dr. Javier P. Arrizon Gaviño**

**CO-DIRECTOR: Dra. Lorena Amaya Delgado**

**ASESOR: Dr. Jorge A. Rodríguez González**



**GUADALAJARA, JAL. OCTUBRE 2015**



CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Guadalajara, Jalisco a 29 de septiembre del 2015

CONSEJO GENERAL DEL POSGRADO  
INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial del estudiante **RAYMUNDO TRUJILLO GARCÍA**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “**PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE UNA  $\beta$ -FRUCTOFURANOSIDASA CON ACTIVIDAD FRUCTOSILTRANSFERASA PRODUCIDA POR LA LEVADURA *Torulaspora delbrueckii***” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el alumno para aspirar al grado de Maestro en Ciencia y Tecnología en la opción terminal de Biotecnología Productiva durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente a los 29 del mes de septiembre del año 2015

Dr. Javier P. Arrizon Gaviño  
*Tutor Académico*

Dra. Lorena Amaya Delgado  
*Tutor en Planta*

Dr. Jorge A. Rodríguez González  
*Asesor académico*



CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Guadalajara, Jalisco a 29 de septiembre del 2015

CONSEJO GENERAL DEL POSGRADO  
INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del Jurado del Examen de Grado del estudiante **RAYMUNDO TRUJILLO GARCÍA**, una vez leída y revisada la Tesis titulada **“PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE UNA  $\beta$ -FRUCTOFURANOSIDASA CON ACTIVIDAD FRUCTOSILTRANSFERASA PRODUCIDA POR LA LEVADURA *Torulaspora delbrueckii*”** aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el alumno para aspirar al grado de Maestro en Ciencia y Tecnología en la opción terminal de Biotecnología Productiva durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente a los 29 del mes de Septiembre del año 2015

Dr. Jorge Verdín  
*Presidente*

Dra. Rosa María Camacho Ruíz  
*Secretario*

Dr. Javier Plácido Arrizón Gaviño  
*Vocal*

**Proyecto:**

Nuevas fructosiltransferasas de levaduras No-*Saccharomyces* aisladas de la fermentación del mezcal: alternativa para la síntesis de prebióticos, SEP-CONACYT CB-2012-01-181766.

## DEDICATORIA

*A Dios*

*A quienes amo*

*A mis padres, Raymundo Trujillo Hernández y Teresa García Arenas*

*A mis hermanos, sobrino y personas que me apoyaron*

*Anayatzin, Yair Alexis, Jorge, Emmanuel, Abigail y Gina*

*“La motivación nos impulsa a comenzar y el hábito nos permite continuar”*

*Jim Ryun*

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo fue financiado por el proyecto SEP-CONACYT CB-2012-01-181766. Por todo el apoyo económico y técnico científico para el desarrollo de esta investigación, se extiende el más sincero agradecimiento al CONACYT por la beca de maestría otorgada, al Posgrado Interinstitucional en Ciencia y Tecnología (PICyT), al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ).

Al Dr. Javier Arrizon, le agradezco por aceptarme en su proyecto de investigación, por guiarme y siempre atenderme con mucha disposición para alcanzar cada una de las metas planteadas durante este proyecto. Siempre quedaré en deuda, por depositar en mí su confianza.

A mi comité tutorial, Dra. Lorena Amaya y Dr. Jorge A. Rodríguez por todas las correcciones y sugerencias que me permitieron avanzar en cada etapa del proyecto así como en mi formación académica, muchas gracias por cada recomendación.

A los sinodales de este trabajo, Dr. Jorge Verdín y Dra. Rosa María Camacho

## RESUMEN

Se purificó y caracterizó una  $\beta$ -fructofuranosidasa producida por la levadura *Torulaspora delbrueckii* aislada a partir de la fermentación del mezcal. Varios experimentos de inducción se llevaron a cabo para la producción de la fructanasa, siendo los fructanos de agave (ATF) el mejor inductor, mientras que la sacarosa no indujo la actividad enzimática. La proteína activa se trata de un dímero glicosilado con un peso molecular estimado de 416 kDa. Las especificidades de sustrato se determinaron sobre moléculas con diferente estructura (sacarosa, ATF, inulina y levano) y se compararon con dos invertasas comerciales y una fructanasa comercial. La  $\beta$ -fructofuranosidasa purificada reveló una alta actividad catalítica en sacarosa y propiedades bioquímicas similares a invertasas producidas por *S. cerevisiae* y fructanasas producidas por *K. marxianus*, presentando una menor estabilidad térmica. El efecto de iones reveló que  $Mn^{2+}$  y  $Ca^{+}$  activan la enzima, mientras que  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  y  $Hg^{2+}$  son inhibidores fuertes. La enzima tiene potencial de aplicación industrial en la hidrólisis de sacarosa y fructanos de agave. Este trabajo constituye el primer reporte de la purificación y caracterización de una fructanasa de *Torulaspora delbrueckii*.

## ABSTRACT

A  $\beta$ -fructofuranosidase produced by *Torulaspora delbrueckii* isolated from mezcal fermentation was purified and characterized. Several induction experiments were carried out for fructanase production, Agave tequilana fructans (ATF) was the best inducer while sucrose did not induce  $\beta$ -fructofuranosidase activity. The active protein was a dimeric glycosylated enzyme with an estimated molecular weight of 416 kDa. The substrate specificities were determined on molecules with different structure (Sucrose, ATF, inulin and levan) and compared with two commercial invertases and one commercial fructanase. The purified fructanase revealed a high catalytic activity on sucrose and biochemical properties similar to *S. cerevisiae* invertases and *K. marxianus* fructanases, the exception was a lower thermal stability.  $Mn^{2+}$  and  $Ca^{+}$  activated the enzyme, while  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  and  $Hg^{2+}$  were stronger inhibitors. The enzyme has potential industrial application in sucrose and ATF hydrolysis. This work constitutes the first report of purification and characterization of a fructanase from *Torulaspora delbrueckii*.

## **ÍNDICE**

<b>RESUMEN.....</b>	<b>VII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>XIV</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>XV</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 ALIMENTO FUNCIONAL.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2 PROBIOTICOS Y PREBIÓTICOS.....</b>	<b>18</b>
1.2.1 Probióticos.....	18
1.1.2 Prebióticos.....	19
<b>1.3 FRUCTANOS.....</b>	<b>20</b>
1.3.1 INULINA.....	20
1.3.2 LEVANO.....	22
1.3.3 FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS.....	23
1.3.3.1 PROPIEDADES NUTRICIONALES DE FOS.....	25
1.3.3.2 PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE FOS.....	26
1.3.3.3 HIDRÓLISIS Y SÍNTESIS ENZIMÁTICA.....	26
<b>1.4 GLICOSIL-HIDROLASAS.....</b>	<b>27</b>
1.4.1 FAMILIA GH32 Y GH68.....	27
1.4.2 MECANISMO DE REACCIÓN.....	30
<b>1.5 MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE ENZIMAS CON ACTIVIDAD FRUCTOSILTRANSFERASA.....</b>	<b>32</b>
1.5.1 <i>Torulaspora delbrueckii</i> .....	34
<b>2. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>35</b>
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>36</b>



<b>4. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>37</b>
<b>4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>37</b>
<b>5. METODOLOGÍA</b> .....	<b>38</b>
<b>5.1 MATERIALES</b> .....	38
<b>5.2 CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE EXTRACTO ENZIMÁTICO</b> ..	38
<b>5.3 PURIFICACIÓN ENZIMÁTICA</b> .....	38
<b>5.4 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA</b> .....	39
<b>5.5 DETERMINACIÓN DE ÓPTIMO PH, TEMPERATURA Y TERMO-ESTABILIDAD</b> .....	39
<b>5.6 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS</b> .....	40
<b>5.7 EFECTO DE LOS IONES SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA</b> .....	40
<b>5.8 COMPARACIÓN DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA ENZIMA PURIFICADA CONTRA ENZIMAS COMERCIALES</b> .....	40
<b>5.9 SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE FOS USANDO UNA METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA</b> .....	41
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>42</b>
<b>6.1 PURIFICACIÓN DE LA <math>\beta</math>-FRUCTOFURANOSIDASA DE <i>T. delbrueckii</i></b> .....	42
<b>6.2 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA <math>\beta</math>-FRUCTOFURANOSIDASA PURIFICADA APARTIR DE <i>T. delbrueckii</i></b> .....	44
6.2.1 TERMO-ESTABILIDAD, PH Y TEMPERATURA ÓPTIMOS .....	44
6.2.2 PARÁMETROS CINÉTICOS.....	48
6.2.3 EFECTO DE LOS IONES SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA $\beta$ - FRUCTOFURANOSIDASA DE <i>T. delbrueckii</i> EMPLEANDO SACAROSA .....	49
6.2.4 COMPARACIÓN DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA $\beta$ - FRUCTOFURANOSIDASA PURIFICADA CONTRA ENZIMAS COMERCIALES.....	50
<b>6.3 SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE FOS USANDO UNA METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA</b> .....	53
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>55</b>
<b>8. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>55</b>

<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>56</b>
9.1 ANEXO A. DETERMINACION DE PESO MOLECULAR UTILIZANDO COLUMNA SUPERDEX G 200.....	56
9.2 ANEXO B. CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR EL MÉTODO DEL ÁCIDO DINITROSALICÍLICO (DNS) (Miller G.L. 1959).....	58
9.3 ANEXO C. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR EL METODO DE BRADFORD.....	62
9.4 ANEXO D. RESULTADOS ACADEMICOS .....	64
<b>10. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>69</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Estructura principal de fructanos en la naturaleza producida por plantas y microorganismos, inulina (a), lévano (b), neo-inulina (c), neo-lévano (d) y fructanos ramificados (e). Imagen tomada de (Arrizón, et al., 2014). .....	21
<b>Figura 2</b> Estructura de Lévano .....	23
<b>Figura 3</b> Estructura química de diferentes tipos de FOS (1-kestosa, neo-kestosa y 6-kestosa). .....	24
<b>Figura 4</b> Clasificación como exo o endo dependiendo de su lugar de actuación. ....	27
<b>Figura 5</b> Representación de dominios catalíticos familia GH32 y GH68. Figura adaptada de (W. Lammens, et al., 2009) .....	30
<b>Figura 6</b> Mecanismo de reacción de una invertasa de la pared celular de <i>A. thaliana</i> (GH32). El nucleófilo y el catalizador ácido-base son D23 y E203, respectivamente. Sacarosa (sustrato donante) se hidroliza (agua como aceptor) en fructosa y glucosa (W. Lammens, et al., 2009). Figura adaptada de la Figura 2 en (Willem Lammens, Le Roy, Van Laere, Rabijns, & Van den Ende, 2008). .....	31
<b>Figura 7</b> Levadura <i>Torulaspora delbrueckii</i> vista a microscopio con objetivo 40x. ....	34
<b>Figura 8</b> Gel SDS-PAGE de la purificación parcial (I) y de la enzima pura (II). M (Marcador de peso molecular), EE (Extracto enzimático), PPE (Purificación parcial), PE (Enzima Pura), DE (Enzima Deglicosilada). .....	43
<b>Figura 9</b> Cromatografía de exclusión Superdex G-200. $A_{280\text{ nm}}$ (○), Actividad fructanasa (●). .....	43
<b>Figura 10</b> Efecto de pH sobre la actividad enzimática utilizando inulina como sustrato, de la enzima purificada a partir de <i>T. delbrueckii</i> . .....	45

<b>Figura 11</b> Efecto de pH sobre la actividad enzimática utilizando fructanos de agave como sustrato, de la enzima purificada a partir de <i>T. delbrueckii</i> .....	45
<b>Figura 12</b> Efecto de pH sobre la actividad enzimática utilizando sacarosa como sustrato, de la enzima purificada a partir de <i>T. delbrueckii</i> .....	46
<b>Figura 13</b> Efecto de temperatura a pH 5.0 sobre la actividad enzimática utilizando inulina como sustrato, de la enzima purificada a partir de <i>T. delbrueckii</i> .....	46
<b>Figura 14</b> Efecto de temperatura a pH 4.5 sobre la actividad enzimática utilizando fructanos de agave como sustrato, de la enzima purificada a partir de <i>T. delbrueckii</i> .....	47
<b>Figura 15</b> Efecto de temperatura a pH 5.5 sobre la actividad enzimática utilizando sacarosa como sustrato, de la enzima purificada a partir de <i>T. delbrueckii</i> .....	47
<b>Figura 16</b> Efecto de los iones sobre la hidrólisis de sacarosa por la fructanasa extracelular de <i>T. delbrueckii</i> .....	49
<b>Figura 17</b> Comparación de hidrólisis enzimática sobre Sacarosa, seguidos por DNS con <i>T. delbrueckii</i> (▼), Invertasa 1(●), Invertasa 2 (○), y Fructozyme (Δ). .....	50
<b>Figura 18</b> Comparación de hidrólisis enzimática sobre inulina, seguidos por DNS con <i>T. delbrueckii</i> (▼), Invertasa 1(●), Invertasa 2 (○), y Fructozyme (Δ). .....	51
<b>Figura 19</b> Comparación de hidrólisis enzimática sobre Fructanos de agave, seguidos por DNS con <i>T. delbrueckii</i> (▼), Invertasa 1(●), Invertasa 2 (○), y Fructozyme (Δ). .....	52
<b>Figura 20</b> Superficie de respuesta estimada en área de pico cromatográfico de FOS en función de pH y relación S/E, después de 84 horas de reacción.....	53
<b>Figura 21</b> Diagrama de Pareto para el efecto estandarizado.....	54
<b>Figura 22</b> Curva de calibración $K_{av}$ Vs $LOG_{10}PM$ .....	57
<b>Figura 23</b> Fundamento método Ácido Dinitrosalicílico (DNS) (Miller G.L. 1959).....	58
<b>Figura 24</b> Curva estándar de DNS pH 4.0 .....	60

<i>Figura 25</i> Curva estándar de DNS pH 4.5 .....	60
<i>Figura 26</i> Curva estándar de DNS pH 5.0 .....	60
<i>Figura 27</i> Curva estándar de DNS pH 5.5 .....	61
<i>Figura 28</i> Curva estándar de DNS pH 6.0 .....	61
<i>Figura 29</i> Curva estándar de DNS pH 6.5 .....	61
<i>Figura 30</i> Curva estándar de DNS pH 7.0 .....	62
<i>Figura 31</i> Curva estándar de BSA ( $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), cuantificado por el método de Bradford (1976). .....	63

## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1</i> Contenido promedio de inulina en diferentes especies vegetales.....	22
<i>Tabla 2</i> Origen y tipo de actividad enzimática para GH 32 y GH 68. ....	28
<i>Tabla 3</i> Motivos conservados en los sitios activos de las estructuras resueltas.....	29
<i>Tabla 4</i> Comparación de las propiedades catalíticas de fructanasas en diferentes levaduras caracterizadas .....	33
<i>Tabla 5</i> Condiciones de pH y relación Sustrato/Enzima (S/E) para cada experimento del diseño superficie de respuesta.....	41
<i>Tabla 6</i> Tabla de purificación enzimática de la $\beta$ -fructofuranosidasa de <i>T. delbrueckii</i> ....	42
<i>Tabla 7</i> Temperatura y pH óptimos para la fructanasa purificada de <i>T. delbrueckii</i> . ....	44
<i>Tabla 8</i> Parámetros cinéticos de la fructanasa extracelular purificada a partir de <i>T. delbrueckii</i> .....	48
<i>Tabla 9</i> Datos para curva de calibración de la columna Superdex g-200 16/60 .....	56
<i>Tabla 10</i> Composición de reactivo DNS.....	59

## **ABREVIATURAS**

CAZY: carbohydrate Active enZYmes. Servidor especializado en el estudio de enzimas que degradan, modifican o forman enlaces glicosídicos

EC número: Enzyme Commission number

FOS: Fructooligosacáridos

FPLC: Fast Protein Liquid Chromatography

GH: Glicosil Hidrolasa

GOS: Galactooligosacáridos

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

IR: Índice de refracción

IUBMB: Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular

$K_{cat}$ : Constante de especificidad

$K_m$ : Constante de Michaelis-Menten

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

$V_{max}$ : Velocidad máxima

YPD: Medio de cultivo (Extracto de levadura, peptona y dextrosa)

## **1. INTRODUCCIÓN**

El término Fructooligosacáridos (FOS) es usado hoy en día para oligómeros de fructosa, que contienen una unidad de glucosa y de 2 a 4 unidades de fructosa unidas por un enlace glicosídico  $\beta$ -2,1 o  $\beta$ -2,6 (Silva et al., 2013). Estos FOS constituyen una importante clase de carbohidratos debido a la  $\beta$ -configuración del C2 anomérico en sus monómeros de fructosa, la inulina y la oligofructosa son resistentes a la hidrólisis por enzimas digestivas humanas, debido a esto, los fructooligosacáridos son clasificados como oligosacáridos no digeribles lo que los hace que actúen como prebióticos (Chen et al.; Roberfroid, 2000). De las principales características prebióticas que presentan es que no son cariogénicos, brindan resistencia a infecciones, son de bajo dulzor y brindan una baja energía calórica, mejoran la absorción de minerales en el tracto gastrointestinal, no son digeribles lo que ayuda a estimular el crecimiento y desarrollo de la microflora gastrointestinal también llamada probiótica (Moore et al., 2003).

Los FOS de grado alimenticio comercialmente pueden ser obtenidos de diversas fuentes o procesos industriales (Swennen, Courtin, & Delcour, 2006): En primer caso tenemos que se encuentran naturalmente en distintos alimentos de consumo humano como pueden ser: Fructanos (inulina de achicoria) o fructanos de agave. Por otra parte, se pueden producir por la hidrólisis de cadenas largas o síntesis química, o enzimática a partir de sacarosa.

La hidrólisis y síntesis enzimática de FOS es llevada a cabo por enzimas  $\beta$ -fructofuranosidasas y fructosiltransferasas respectivamente, las  $\beta$ -fructofuranosidasas pueden desplazar el equilibrio hacia la síntesis a altas concentraciones de sacarosa. Como por ejemplo, las enzimas reportadas de hongos del género *Aspergillus* y *Aureobasidium* (Hernalsteens & Maugeri, 2008c; Yun, 1996). En bacterias incluyen estudios en *Bacillus macerans*, *Zymomonas mobilis*, *Lactobacillus reuteri*, a pesar del conocimiento que se tiene sobre la producción de invertasas, poco se puede encontrar de levaduras productoras de enzima capaces de producir FOS (Hernalsteens & Maugeri, 2010; Santos, 2003; Yun, 1996).

De las levaduras reportadas para la producción de enzimas capaces de sintetizar FOS son del género *Schwanniomyces occidentalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces Marxianus*, *Rhodotorula dairenensis*, *Cryptococcus sp.* *Kluyveromyces*, *Rhodotorula sp.*, *Candida*, (Álvaro-Benito et al., 2007; Andjelković, Pićurić, & Vujčić, 2010; Arrizon,



Morel, Gschaedler, & Monsan, 2011; Gutiérrez-Alonso, Fernández-Arrojo, Plou, & Fernández-Lobato, 2009; Hernalsteens & Maugeri, 2008b; Nemukula, Mutanda, Wilhelmi, & Whiteley, 2009).

Arrizon et al (2012) reportaron por primera vez que *Candida apicola* y *Torulaspora delbrueckii* son levaduras con potencial para la producción de enzimas capaces de sintetizar FOS.

El mecanismo de acción de las fructosiltransferasas depende de la fuente, en el caso de las plantas se necesita de una serie de enzimas que actúan de manera secuencial, casi siempre una enzima realiza la síntesis del precursor mientras que otra realiza la elongación de la polimerización (van Arkel et al., 2012). En el caso de los microorganismos una sola enzima realiza esta reacción, esta actúa sobre la sacarosa en una reacción no-proporcional, en donde una molécula de sacarosa sirve como donador y otra como aceptor (Maiorano, Piccoli, da Silva, & de Andrade Rodrigues, 2008; Rodríguez, Sánchez, & Alméciga-Díaz, 2010).

Debido al creciente interés de la industria alimenticia por los fructooligosacáridos, se han buscado nuevas enzimas con capacidad catalítica de síntesis de FOS, así como la respectiva optimización de su aplicación en procesos enzimáticos constituye una ventaja tecnológica. Por lo que en este trabajo se presenta por primera vez, la purificación y caracterización bioquímica de una  $\beta$ -fructofuranosidasa purificada a homogeneidad de una levadura *Torulaspora delbrueckii* aislada del mezcal, incluyendo su evaluación en reacciones de transfructosilación a partir de sacarosa para la síntesis de fructooligosacáridos.

## 1.1 ALIMENTO FUNCIONAL

Desde 1980 ha existido un gran interés sobre el estudio de la microflora gastro-intestinal, tanto para los seres humanos como para los animales (Hernalsteens & Maugeri, 2010). Por lo que el desarrollo de alimentos funcionales ha tenido gran desarrollo en los últimos años. Un Alimento funcional es aquel que actúa beneficiosamente sobre una o más funciones del cuerpo, mejorando la salud y el bienestar y/o reduciendo el riesgo de enfermedad (Olagnero et al., 2007). Un alimento funcional debe seguir siendo un alimento y debe además demostrar sus efectos en las cantidades en que normalmente se espere sea consumido en la dieta: no es una píldora o cápsula, sino que es parte del patrón alimentario habitual (Action, 1999). Muchos de los alimentos funcionales que se comercializan hoy en día basan su composición en probióticos y prebióticos, entre otras moléculas bioactivas.

## 1.2 PROBIOTICOS Y PREBIÓTICOS

### 1.2.1 Probióticos

El término "probiótico" se introdujo por primera vez en 1965 por Lilly y Stillwell; en contraste con los antibióticos, los probióticos se definieron como factores derivados de microbios que estimulan el crecimiento de otros organismos. En 1989, Roy Fuller hizo hincapié en el requisito de la viabilidad de los probióticos e introdujo la idea de que tienen un efecto beneficioso en el hospedero. Los probióticos son microorganismos vivos que se pueden formular en diferentes tipos de productos, incluyendo alimentos, medicamentos y suplementos dietéticos.

Las especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son los más utilizados como probióticos, pero especies de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y algunas de *E. coli* y *Bacillus* también se utilizan como probióticos. Bacterias del ácido láctico, incluyendo las especies de *Lactobacillus*, que se han utilizado para la conservación de los alimentos por fermentación durante miles de años, pueden realizar una doble función al actuar como

agentes para la fermentación de alimentos y, además, potencialmente impartir beneficios para la salud. En sentido estricto, sin embargo, el término "probiótico" debe reservarse para microorganismos vivos en los cuales se ha demostrado en estudios controlados en humanos que generan un beneficio para la salud (Guarner et al., 2008).

### 1.1.2 Prebióticos

Los prebióticos fueron definidos por Gibson y Roberfroid en 1995 como “ingredientes que no son hidrolizados por las enzimas intestinales y que ejercen un efecto positivo para la salud porque estimulan selectivamente el crecimiento de microorganismos benéficos, mientras que inhiben el crecimiento de potenciales especies perjudiciales”(Gibson, Probert, Van Loo, Rastall, & Roberfroid, 2004).

A diferencia de los probióticos, la mayoría de los prebióticos se utilizan como ingredientes en alimentos como pueden ser: galletas, cereales, chocolate, y productos lácteos. Los Prebióticos comúnmente conocidos son: la oligofructosa, la inulina, galactooligosacáridos, la lactulosa y oligosacáridos de la leche materna.

La lactulosa es un disacárido sintético que se usa como un medicamento para el tratamiento del estreñimiento y la encefalopatía hepática. La oligofructosa prebiótica se encuentra naturalmente en muchos alimentos, como el trigo, cebollas, plátanos, miel, ajo y puerros. La oligofructosa también se pueden aislar de la raíz de achicoria o sintetizarse enzimáticamente a partir de sacarosa. La fermentación de oligofructosa tiene un gran número de efectos fisiológicos, incluyendo: aumentar el número de bifidobacterias en el colon, al aumento de la absorción de calcio (Guarner, et al., 2008).

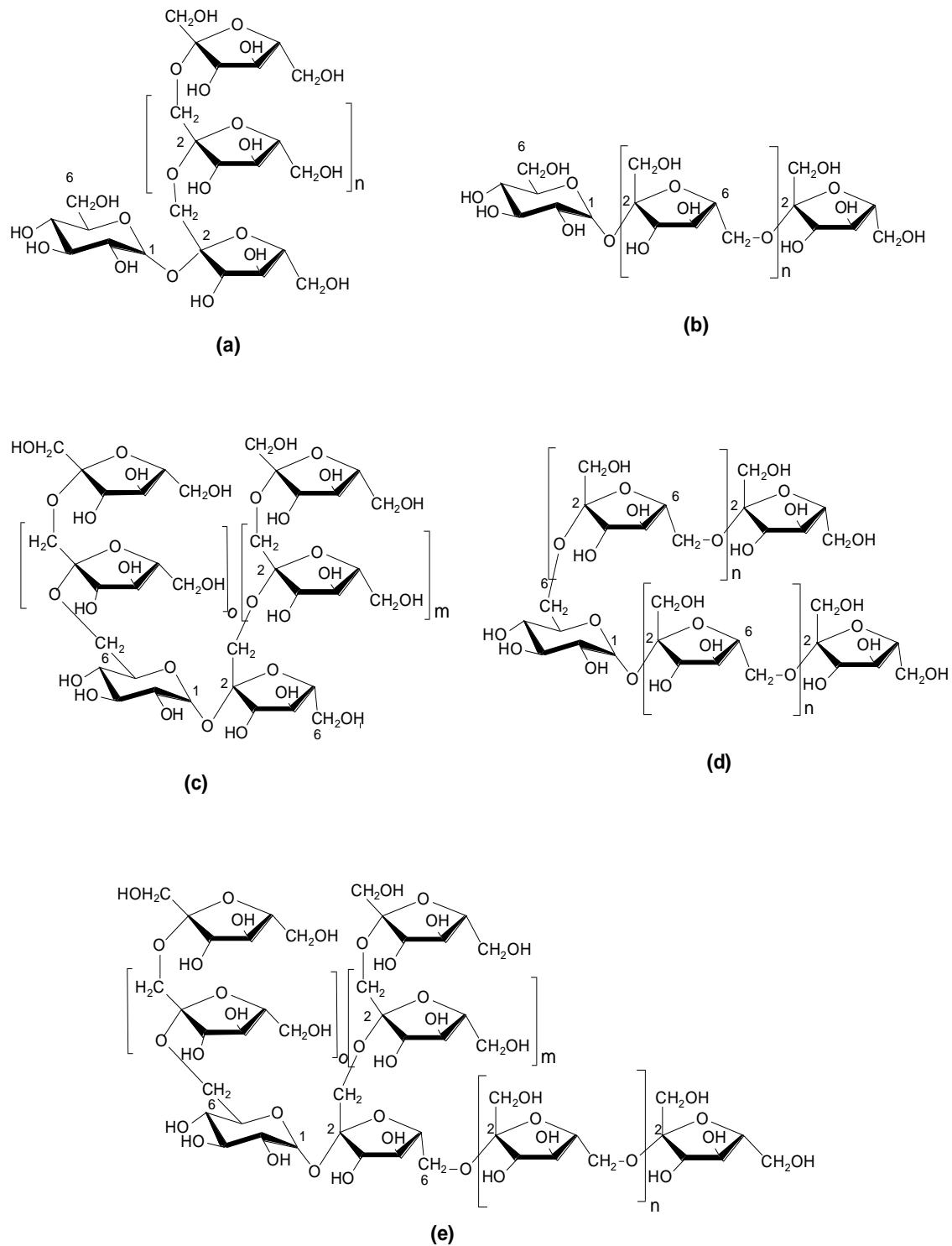
### 1.3 FRUCTANOS

Las moléculas con propiedades prebióticas más estudiadas son la inulina y los fructooligosacáridos. Ambas sustancias, junto con el Lévano, se incluyen en un grupo de compuestos denominados fructanos. Los fructanos son moléculas de  $\beta$ -fructosil-fructosa producidos por una amplia gama de bacterias, levaduras u hongos y se producen también por fructosiltransferasas especializadas en plantas, pero no se encuentran en el reino animal (Almeciga-Diaz et al., 2011). Los fructanos presentan diferentes tipos de ramificaciones y grados de polimerización como se muestra en la Figura 1.

En las plantas, después de almidón y sacarosa, los fructanos son los hidratos de carbono de almacenamiento más importantes, presentes en aproximadamente el 15% de plantas con flores. Los fructanos son importantes para la supervivencia de las plantas, especialmente bajo condiciones de sequía y bajas temperaturas. Además de ser una fuente de nutrición cuando la producción de alimentos se limita (Brocklebank & Hendrÿ, 1989; Johnson et al., 2013). En los organismos microbianos los fructanos ayudan a resistir el estrés ambiental y a la asimilación de nutrientes. También pueden proteger a las células microbianas de la fagocitosis y compuestos antibióticos (Arrizón et al., 2014).

#### 1.3.1 INULINA

La inulina es un carbohidrato de reserva energética presente en más de 36 000 especies de plantas, aislada por primera vez en 1804, a partir de la especie *Inula helenium*, por un científico alemán de apellido Rose. En 1818, Thomson, un científico británico, le dio el nombre actual (Stephen & Phillips, 2006). La inulina está constituida por moléculas de fructosa unidas por enlaces  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1) fructosil-fructosa (Madrigal & Sangronis, 2007).



**Figura 1** Estructura principal de fructanos en la naturaleza producida por plantas y microorganismos, inulina (a), lévano (b), neo-inulina (c), neo-lévano (d) y fructanos ramificados (e). Imagen tomada de (Arrizón, et al., 2014).

Entre las especies de plantas que producen inulina se identifican las del grupo *Liliaceae* (ajo, cebolla espárrago, ajoporro) y *Compositae* (achicoria, patata o tupinambo y yacon) (Tabla 1). Las especies con mayor contenido de inulina la almacenan en la parte subterránea de la planta, otras especies (por ejemplo en la familia *Gramineae*) presentan altos contenidos de fructanos en sus partes aéreas, pero con bajo rendimiento de extracción a nivel industrial, a comienzos de la presente década, la inulina se obtiene a partir de dos especies: la patata (*Helianthus tuberosus*) y la achicoria (*Cichorium intybus*), siendo ésta última la fuente industrial más común (Flamm, Glinsmann, Kritchevsky, Prosky, & Roberfroid, 2001).

**Tabla 1** Contenido promedio de inulina en diferentes especies vegetales

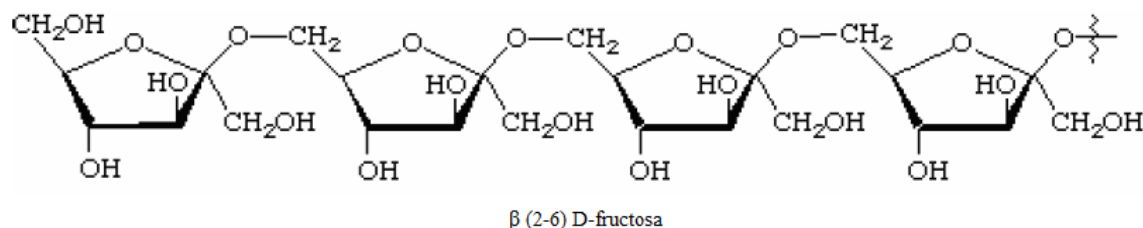
<b>Especie vegetal Inulina</b>	<b>Inulina (g/100g base seca)</b>
<b>Patata (<i>Helianthus tuberosus</i>)</b>	89
<b>Achicoria (<i>Cichorium intybus</i>)</b>	79
<b>Raíz de Dalia (<i>Dahlia spp.</i>)</b>	59
<b>Cebolla (<i>Allium cepa</i> L.)</b>	48
<b>Ajoporro (<i>Allium porrum</i> L.)</b>	37
<b>Ajo (<i>Allium sativum</i>)</b>	29
<b>Yacon (<i>Smallanthus sonchifolius</i>)</b>	27
<b>Espárrago (<i>Asparagus officinalis</i> L.)</b>	4
<b>Cambur (<i>Musa cavendishii</i>)</b>	2
<b>Centeno (<i>Secale cereale</i>)</b>	1

Tabla tomada de (Madrigal & Sangronis, 2007)

### 1.3.2 LEVANO

Los levanos son polifruktanos unidos por enlaces  $\beta$  (2-6) (Figura 2), de alto peso molecular solubles en agua con rotación óptica negativa, formados por la acción de la enzima levano-sacarasa que hidroliza la sacarosa y transfiere la D-fructosa a cadenas crecientes de fructanos para formar levanos producidos por microorganismos como *Pseudomonas fluorescens*, *Corynebacterium beticola* y especies de *Bacillus* sp. (Y. Han & Watson, 1992; Serrano Galvis, 2006).

Los levanos que son producidos a partir de sacarosa, presentan potencial en aplicaciones industriales, tales como revestimiento de superficie o estabilización de la emulsión, debido a su baja viscosidad y alta solubilidad en agua, los levanos pueden ser un potencial sustituto de la goma árabiga (Y. Han & Watson, 1992; Y. W. Han, 1990).



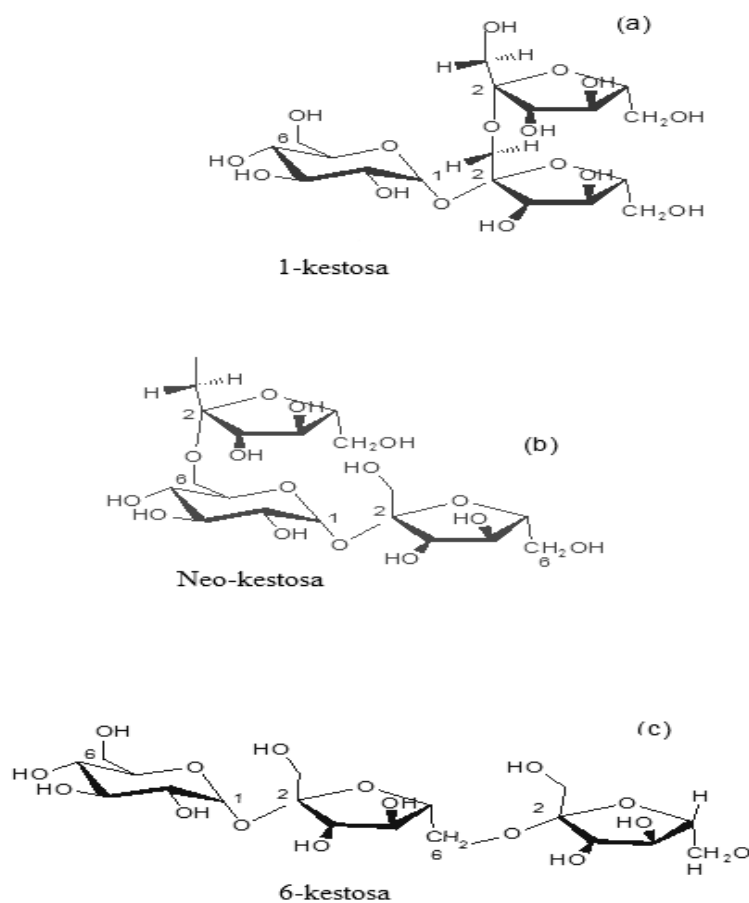
**Figura 2** Estructura de Lévano

### 1.3.3 FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS

El término Fructooligosacáridos (FOS) es usado hoy en día para oligómeros de fructosa, que contienen una unidad de glucosa y de 2 a 4 unidades de fructosa unidas por un enlace glicosídico  $\beta$ -2,1 (Silva, et al., 2013). Estos FOS constituyen una importante clase de carbohidratos debido a la  $\beta$ -configuración del C2 anomérico en sus monómeros de fructosa, la inulina y la oligofructosa son resistentes a la hidrólisis por enzimas digestivas humanas, debido a esto, los fructooligosacáridos son clasificados como oligosacáridos no digestibles lo que los hace que actúen como prebióticos (Chen, et al.; Roberfroid, 2000).

De las principales características prebióticas que presentan es que no son cariogénicos, brindan resistencia a infecciones, son de bajo dulzor y brindan una baja energía calórica, mejoran la absorción de minerales en el tracto gastrointestinal, no son digeribles lo que ayuda a estimular el crecimiento y desarrollo de la microflora gastrointestinal también llamada probiótica (Moore, et al., 2003).

Los FOS pueden presentar diferentes tipos de acuerdo a su estructura química (Figura 3). Los FOS tipo inulina consisten principalmente de unidades  $\beta$ -D-fructosil lineales unidos por enlaces  $\beta$  (2-1), de los cuales el más conocido es 1-kestosa. Los FOS tipo neo-inulina tienen una estructura consistente de unidades  $\beta$ -D-fructosil unidas al C-1 y C-6 de las unidades glucosil mediante enlaces  $\beta$  (2-1) o  $\beta$  (2-6), siendo la neo-kestosa la más conocida. Los FOS tipo lévano consisten principalmente en unidades  $\beta$ -D-fructosil lineales unidos por enlaces  $\beta$  (2-6), siendo la 6-kestosa la mayoritaria de este tipo (Tian, Karboune, & Hill, 2014).



**Figura 3** Estructura química de diferentes tipos de FOS (1-kestosa, neo-kestosa y 6-kestosa).



### 1.3.3.1 PROPIEDADES NUTRICIONALES DE FOS

El consumo de FOS tiene beneficios potenciales, ya que los FOS son una fibra dietética soluble y es resistente a la digestión por enzimas endógenas, reduce el pH fecal, disminuye el tiempo de tránsito gastrointestinal (Hidaka, Eida, Takizawa, Tokunaga, & Tashiro, 1986). Al igual que otras fibras solubles, se ha demostrado que los FOS pueden mejorar el estreñimiento moderado, reducir el colesterol y para moderar la absorción de glucosa en adultos (Moore, et al., 2003).

Otro de los beneficios que presenta la administración de prebióticos tipo FOS en la dieta es la mejora de la absorción de minerales tan importantes como el Ca y el Mg. El intestino delgado es la zona donde normalmente estos minerales se absorben pero gracias a los ácidos grasos de cadena corta generados como productos de la flora intestinal tras la ingesta de prebióticos, el colon también es capaz de absorberlos de manera eficiente (Lafraya Aguado, 2011).

La dieta humana es conocida por influir en la composición de las especies y las características metabólicas de la microbiota intestinal, y por lo tanto en la conversión de procarcinógenos a agentes carcinógenos. Se ha reportado una relación entre el alto contenido de grasa y proteínas en la dieta de la sociedad occidental y mayores densidades de bacterias de putrefacción, elevada actividad de enzimas reductoras, y un aumento de la incidencia de cáncer colorrectal. Otra prueba es proporcionada por la relación inversa entre el riesgo de cáncer de colon y el consumo de fibra dietética (Arrizón, et al., 2014). La recomendación nutricional de FOS posee diferencias actualmente, en Estados Unidos el consumo diario recomendado es de 1 a 4 g por día mientras que en Europa se sugiere un consumo de 3 a 11 g por día (Olagnero, et al., 2007).

De todos los polisacáridos y oligosacáridos no digeribles, los Fructooligosacáridos son los más conocidos y utilizados como prebióticos debido a que estos cumplen con todos los criterios de seguridad alimentaria.

### 1.3.3.2 PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE FOS

La investigación sobre métodos de producción de oligosacáridos para alimentación comenzó en Japón en los años 1970-1975. Desde entonces el desarrollo de nuevos compuestos con propiedades funcionales ha continuado y el mercado también sigue expandiéndose gradualmente (Nakakuki, 2005). En el año 1990 se produjeron 4 000 toneladas de FOS, mientras que en el 1995 fueron 12 000 (Lafraya Aguado, 2011). En la actualidad no se conoce a ciencia cierta qué cantidad de FOS se producen anualmente en el mundo, lo más reciente indica que sólo en Japón se generaron 3 500 toneladas de FOS y 6 500 de GOS, aun cuando la producción de FOS es menor a la de GOS, esta irá en aumento debido a que en Europa los FOS son el prebiótico más empleado, principalmente porque han sido los compuestos bifidogénicos mejor estudiados y caracterizados (Lafraya Aguado, 2011; Nakakuki, 2005).

En la actualidad la producción de fructooligosacáridos (FOS) para la formulación de alimentos funcionales ha cobrado importancia económica, estos compuestos se obtienen actualmente con procesos enzimáticos patentados mediante la hidrólisis enzimática de fructanos largos, o mediante reacciones de transfructosilación a partir de sacarosa.

### 1.3.3.3 HIDRÓLISIS Y SÍNTESIS ENZIMÁTICA

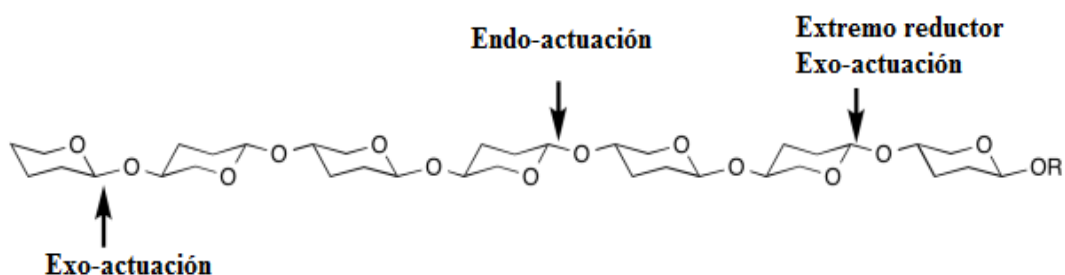
Los Fructooligosacáridos de grado alimenticio comercialmente pueden ser obtenidos de diversas fuentes o procesos industriales: Naturalmente se encuentran en distintos alimentos de consumo humano como pueden ser: Fructanos (inulina), Oligosacáridos de la Soya como Rafinosa y estequiosa por extracción directa del concentrado de Soya (Swennen, et al., 2006).

Industrialmente, los fructooligosacáridos pueden ser obtenidos por dos procesos enzimáticos, el primer método es por la hidrólisis enzimática de fructanos largos, produciendo una gran cantidad de FOS pero sin glucosa en su estructura. En el segundo los FOS se producen a partir del disacárido sacarosa usando la actividad transfructosilación de

enzimas fructosiltransferasas, también conocidas como  $\beta$ -fructofuranosidasas debido a una actividad secundaria obtenida a altas concentraciones de sacarosa. Estas enzimas que presentan un alto grado de homología sobre la secuencia de sus aminoácidos, se clasifican en la familia 32 Y 68 de las glicosil-hidrolasas (GH, CE 3.2.1.x), de acuerdo al servidor Carbohydrate-Active enZYmes (<http://www.cazy.org/>) (Álvaro-Benito, et al., 2007). Se necesita una elevada concentración de sustrato inicial para una eficaz transfructosilación (Arrizón, et al., 2014; Rodríguez, et al., 2010). Los FOS que son sintetizados enzimáticamente contienen diferentes unidades de fructosa (dependiendo de la fuente enzimática) y una molécula de glucosa en su estructura (Figura 1).

#### 1.4 GLICOSIL-HIDROLASAS

Las GH son un grupo amplio de enzimas que hidrolizan el enlace glicosídico entre dos o más carbohidratos, o entre un hidrato de carbono y un resto no-carbohidrato o que son capaces de sintetizar un enlace glicosídico (figura 5). La nomenclatura IUBMB Enzyme de las GH se basa en su especificidad de sustrato y ocasionalmente en su mecanismo molecular; tal clasificación no refleja las características estructurales de estas enzimas (Steve Withers, 2015). Otra clasificación de estas enzimas es dependiendo a la capacidad que tienen para hidrolizar un sustrato en el extremo (con mayor frecuencia, pero no siempre es el extremo reductor) o por la mitad de la cadena del sustrato. Exo si hidroliza en el extremo y Endo si hidroliza dentro de la cadena (Figura 4) (W. Lammens et al., 2009; Steve Withers, 2015).



**Figura 4** Clasificación como exo o endo dependiendo de su lugar de actuación.

##### 1.4.1 FAMILIA GH32 Y GH68

Las familias GH32 y GH68 se agrupan en el clan GH-J. El Clan GH-J no solo alberga hidrolasas típicas, sino también transferasas tipo fructosiltransferasas, que participan en la síntesis de fructanos. La familia GH32 comprende invertasas (provenientes de hongos y bacterias), endo- y exo-inulinasas, levanasas. La familia GH68 incluye levansacarosas bacterianas, inulosucrasas y algunas  $\beta$ -fructofuranosidasas (Lafraya Aguado, 2011; W. Lammens, et al., 2009).

Las enzimas de la familia GH32 proceden de bacterias, hongos o plantas (Tabla 2) y la mayoría contienen, además del dominio  $\beta$ -propeller característico del clan GH-J, un dominio adicional C-terminal (Figura 5), que hasta el momento no se conoce la funcionalidad a ciencia cierta, pero se cree le confiere estabilidad a las enzimas (W. Lammens, et al., 2009).

**Tabla 2** Origen y tipo de actividad enzimática para GH 32 y GH 68.

<b>Familia</b>	<b>Origen</b>	<b>Tipo de actividad enzimática</b>
<b>GH 32</b>	Plantas	Invertasa Exo-fructanhidrolasa Fructosiltransferasa
	Levaduras y Hongos	Invertasa Exo-fructanhidrolasa Endo-fructanhidrolasa Fructosiltransferasa
	Bacteria	$\beta$ -fructosidasa
<b>GH 68</b>	Bacteria	Fructosiltransferasas <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inulosucrasas</li> <li>• Levansucrasa</li> <li>• Otras fructosiltransferasas</li> </ul>

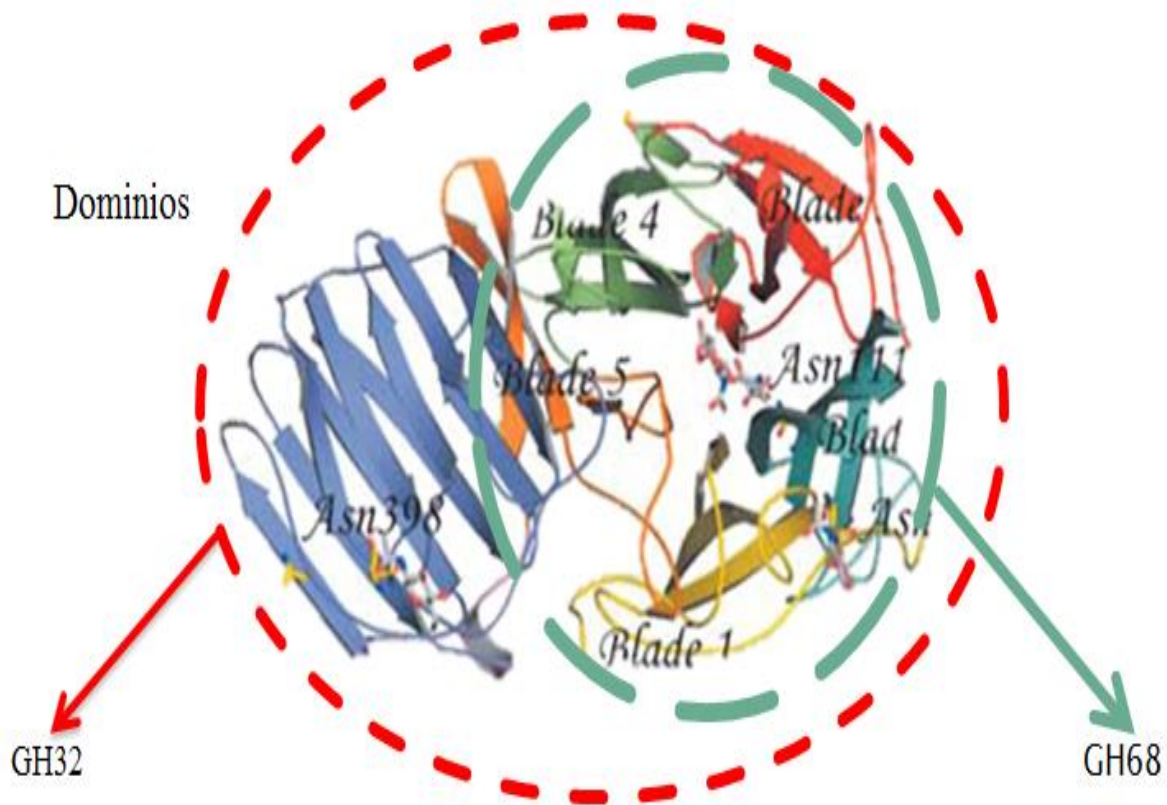
Tabla adaptada de (Arrizón, et al., 2014)

Se han determinado tres residuos ácidos conservados, dos aspárticos (D) y un glutámico (E), conocidos como la tríada catalítica que son indispensables para la unión a sustrato y la catálisis (Tabla 3). Estos tres residuos se localizan en tres motivos conservados “WMNDPNG”, “EC” y “RDP” (W. Lammens, et al., 2009).

El ácido aspártico del motivo “RDP” no parece estar directamente involucrado en el mecanismo catalítico, sino que probablemente esté implicado en la estabilización del estado de transición. Los primeros estudios sobre las invertasas de levadura extracelular identificaron al Asp23 del motivo WMNDPNG como el nucleófilo y Glu204 del motivo CE como el catalizador ácido / base (W. Lammens, et al., 2009; Reddy & Maley, 1996). Pero recientes estudios de estructura y función revelaron que dos aminoácidos esenciales (W y N) en este motivo son importantes para el desarrollo de la actividad de transfructosilación. El motivo CE también contiene, junto al catalizador ácido / base general, una cisteína conservada. Sin embargo, en la familia GH68 tiene una arginina en esa posición (Lafraya Aguado, 2011; W. Lammens, et al., 2009; Reddy & Maley, 1996).

**Tabla 3** Motivos conservados en los sitios activos de las estructuras resueltas

Familias	Motivos		
	Nucleófilo (Asp)	Catalizador ácido / Base (Glu)	Estabilizador de (Asp)
GH68	WMND <u>P</u> NG	<u>E</u> C	R <u>D</u> P
	DVW <u>D</u> SWP	I <u>E</u> RAN	R <u>D</u> P
	WVW <u>D</u> TWT	T <u>E</u> RPQ	R <u>D</u> P
GH32	WMND <u>P</u> NG	W <u>E</u> CPD	R <u>D</u> P
	WMND <u>P</u> NG	I <u>E</u> CPD	R <u>D</u> P
	WMND <u>P</u> NG	W <u>E</u> CPG	R <u>D</u> P
	WMND <u>P</u> NG	W <u>E</u> CPD	R <u>D</u> P



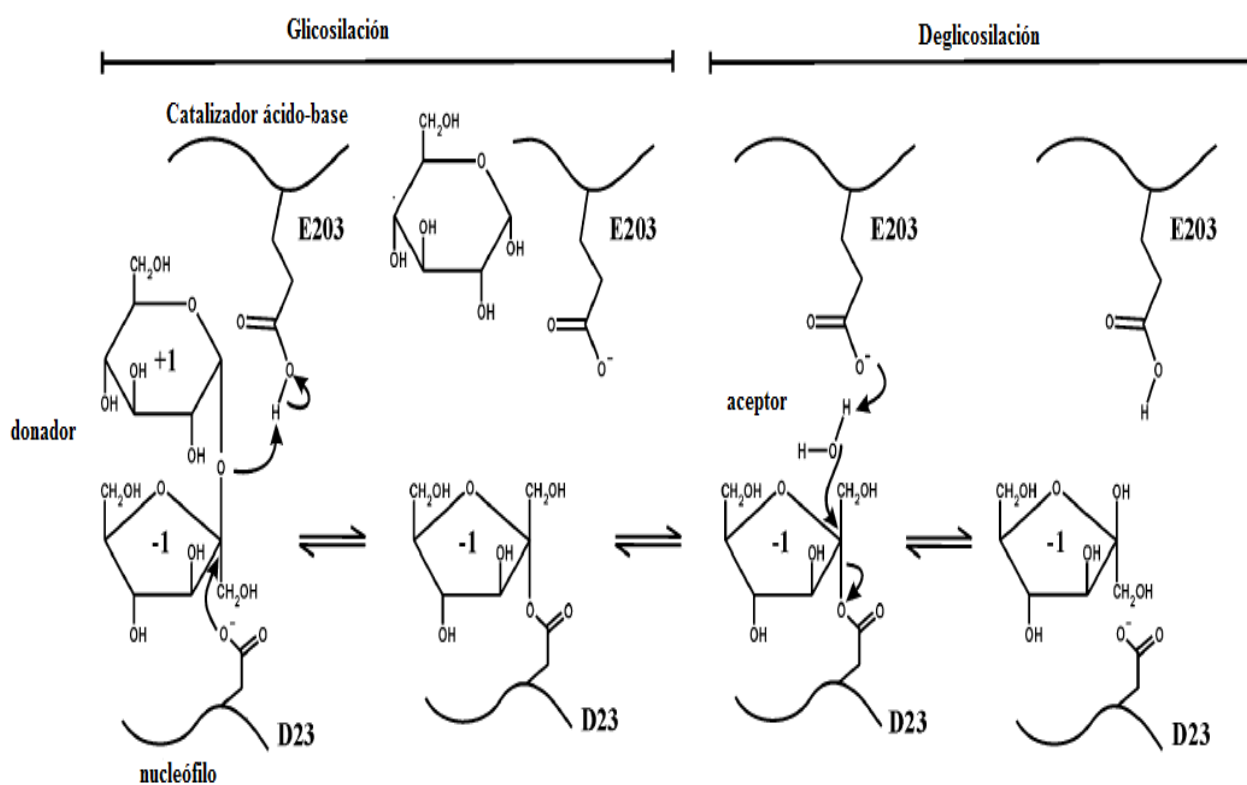
**Figura 5** Representación de dominios catalíticos familia GH32 y GH68. Figura adaptada de (W. Lammens, et al., 2009)

#### 1.4.2 MECANISMO DE REACCIÓN

La formación de un nuevo enlace glicosídico que tiene lugar en una reacción de transfructosilación y la hidrólisis de ese mismo enlace, son reacciones con un mecanismo catalítico muy similar y por tanto son potencialmente catalizables por una misma enzima (Lafraya Aguado, 2011).

El mecanismo catalítico implica una reacción de dos etapas en el cual un enlace covalente intermedio glicosil-enzima se forma y se hidroliza mediante un estado de transición del ion oxocarbenio (Figura 6).

En el primer paso (glicosilación) un ataque nucleófilo es realizado en el carbono anomérico del sustrato de azúcar por el carboxilato del nucleófilo, formando un enlace covalente intermedio fructosa-enzima. El catalizador ácido / base actúa como un ácido general al donar un protón al grupo glicosil saliente. En el segundo paso (deglicosilación) el catalizador ácido / base actúa como una base general, eliminando un protón del aceptor fructosil entrante (agua o un azúcar apropiado como aceptor, dependiendo si es hidrólisis o síntesis), el cual hidroliza el enlace enzima fructosa (W. Lammens, et al., 2009).



**Figura 6** Mecanismo de reacción de una invertasa de la pared celular de *A. thaliana* (GH32). El nucleófilo y el catalizador ácido-base son D23 y E203, respectivamente. Sacarosa (sustrato donante) se hidroliza (agua como aceptor) en fructosa y glucosa (W. Lammens, et al., 2009). Figura adaptada de la Figura 2 en (Willem Lammens, Le Roy, Van Laere, Rabijns, & Van den Ende, 2008).

## 1.5 MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE ENZIMAS CON ACTIVIDAD FRUCTOSILTRANSFERASA

Debido al creciente interés de la industria alimenticia por los fructooligosacáridos, se han buscado nuevas enzimas con capacidad catalítica de síntesis de FOS, así como la respectiva optimización de su aplicación en procesos enzimáticos constituye una ventaja tecnológica

Estas enzimas han sido buscadas y reportadas principalmente de hongos del genero *Aspergillus* y *Aureobasidium*, perteneciendo principalmente a la familia GH 32 (Arrizón, et al., 2014; Hernalsteens & Maugeri, 2008a). En bacterias las enzimas producidas son para la síntesis de fructanos como la inulina y lévianos largos, la mayoría de ellos pertenecen a la familia GH68 (Arrizón, et al., 2014). Los estudios en bacterias se encuentran reportes en *Bacillus macerans*, *Zymomonas mobilis*, *Lactobacillus reuteri*, a pesar del conocimiento que se tiene sobre la producción de invertasas, poco se puede encontrar de levaduras productoras de enzima capaces de producir FOS (Hernalsteens & Maugeri, 2010; Santos, 2003). De las levaduras reportadas para la producción de enzimas capaces de sintetizar FOS (Tabla 4), han sido principalmente *Schwanniomyces occidentalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Rhodotorula dairenensis*, así como otras de los géneros *Cryptococcus* sp., *Kluyveromyces*, *Rhodotorula* sp., *Candida*, (Álvaro-Benito, et al., 2007; Andjelković, et al., 2010; Arrizon, et al., 2011; Gutiérrez-Alonso, et al., 2009; Hernalsteens & Maugeri, 2008b; Nemukula, et al., 2009).

Arrizon et al (2012) reportaron por primera vez que *Candida apicola* y *Torulasporea delbrueckii* son levaduras con potencial para la producción de enzimas capaces de sintetizar FOS.



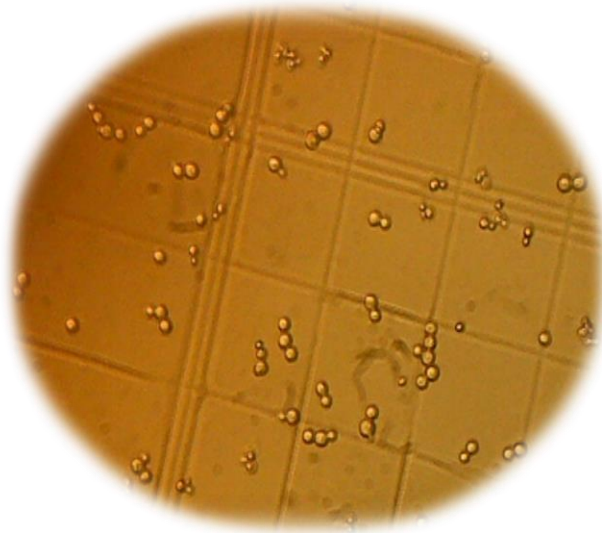
**Tabla 4** Comparación de las propiedades catalíticas de fructanasas en diferentes levaduras caracterizadas

Levadura	Peso Molecular (kDa)	Parámetros Cinéticos		Óptimo		Efecto de iones		Referencia
		K <sub>m</sub> (Mm)	K <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	pH	T (°C)	Activadores	Inhibidores	
<i>K. marxianus</i>	250	29.1 <sup>S</sup> 7.2 <sup>I</sup>	0.33 <sup>S</sup> 0.7 <sup>I</sup>	5 <sup>S</sup> 5 <sup>I</sup>	55 <sup>S</sup> 55 <sup>I</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Hg <sup>2+</sup> Cu <sup>2+</sup> Zn <sup>2+</sup> Mn <sup>2+</sup>	(Arrizon, et al., 2011)
<i>K. marxianus</i>	72	11.9 <sup>S</sup> 3.9 <sup>I</sup>	-	4.4 <sup>I</sup>	55 <sup>I</sup>	Fe <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup> Cu <sup>2+</sup> Zn <sup>2+</sup> Ca <sup>2+</sup> Fe <sup>3+</sup>	(Singh, Dhaliwal, & Puri, 2007)
<i>P. guillermondii</i>	50	21.1 <sup>I*</sup>	-	6 <sup>I</sup>	60 <sup>I</sup>	Ca <sup>2+</sup> K <sup>+</sup> Na <sup>+</sup> Fe <sup>2+</sup> Cu <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup> Hg <sup>2+</sup> Ag <sup>+</sup>	(Gong et al., 2008)
<i>Schw. occidentalis</i>	85	4.9 <sup>S</sup>	80.5 <sup>S</sup>	5.5 <sup>S</sup>	45-55 <sup>S</sup>	-	-	(Álvaro-Benito, et al., 2007)
<i>Cry. aureus</i>	60	20.0 <sup>I*</sup>	-	5 <sup>I</sup>	50 <sup>I</sup>	Ca <sup>2+</sup> K <sup>+</sup> Na <sup>+</sup> Fe <sup>2+</sup> Cu <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup> Hg <sup>2+</sup> Ag <sup>+</sup>	(Sheng, Chi, Gong, & Li, 2008)
<i>Cry. sp.</i>	90-130	64.0 <sup>S</sup>	-	4.5 <sup>I</sup>	60 <sup>S</sup>	K <sup>+</sup> Ca <sup>2+</sup> Zn <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	(Hernalsteens & Maugeri, 2008a)
<i>X. dendrorhous</i>	33	62 <sup>S</sup>	-	6.4 <sup>S</sup>	45 <sup>S</sup>	Al <sup>3+</sup> Li <sup>+</sup> Mn <sup>2+</sup> Ba <sup>2+</sup> Ca <sup>2+</sup>	K <sup>+</sup> Mg <sup>2+</sup> Zn <sup>2+</sup>	(Chen, et al., 2011)
<i>X. dendrorhous</i>	200	4.1 <sup>S</sup>	422 <sup>S</sup>	4.5-6 <sup>S</sup>	65-85 <sup>S</sup>	-	-	(Linde et al., 2012)
<i>C. utilis</i>	62	1.54 <sup>S</sup>	-	4.4 <sup>S</sup>	70 <sup>S</sup>	-	-	(Belcarz, Ginalska, Lobarzewski, & Penel, 2002)
<i>R. sp.</i>	170	-	-	4.4 <sup>S</sup>	70 <sup>S</sup>	-	-	(Hernalsteens & Maugeri, 2008c)
<i>R. sp.</i>	170	-	-	4.5 <sup>S</sup>	67 <sup>S</sup>	Cu <sup>2+</sup> Zn <sup>2+</sup> Ca <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup> Mn <sup>2+</sup>	(Hernalsteens & Maugeri, 2008c)
<i>R. dairensis</i>	680	1.2 <sup>S</sup>	108.3 <sup>S</sup>	5 <sup>S</sup>	55 <sup>S</sup>	-	-	(Gutiérrez-Alonso, et al., 2009)
<i>S. cerevisiae</i>	120	26.1 <sup>S</sup>	9.4X10 <sup>3</sup> <sup>S</sup>	5.5 <sup>S</sup>	-	-	-	(Maley, 1996)
<i>S. cerevisiae</i>	270	25.6 <sup>S</sup>	-	3.5-5 <sup>S</sup>	60 <sup>S</sup>	-	-	(Andjelković, et al., 2010)

<sup>S</sup>: Sacarosa, <sup>I</sup>: Inulina, \* mg•ml<sup>-1</sup>, *Schw*: *Schwanniomyces*, *Cry*: *Cryptococcus*

### 1.5.1 *Torulaspora delbrueckii*

Entre las levaduras aisladas del proceso de fermentación de mezcal, las especies *Torulaspora delbrueckii* (Figura 7) fueron reportados recientemente como nuevos productores  $\beta$ -fructofuranosidasa con fructanos de agave como un inductor más fuerte (Arrizon, et al., 2011). *T. delbrueckii* es un microorganismo GRAS y se asocia con varias actividades humanas, por ejemplo en alimentos y productos fermentados tales como aceites vegetales (Bautista-Gallego et al., 2011), vino (Warren Albertin et al., 2014), queso (Montel et al., 2014), la fermentación del café (Evangelista et al., 2014) y la fermentación de la carne (Mendoza, Padilla, Belloch, & Vignolo, 2014). *Torulaspora delbrueckii* presenta de igual manera interesantes propiedades biotecnológicas (W. Albertin et al., 2014), tales como la tolerancia de congelación (Hernandez-Lopez, Prieto, & Randez-Gil, 2003) y una alta osmotolerancia (Tofalo et al., 2009), que es útil para la fermentación de masa fermentada. En la actualidad, algunos artículos han sido publicado acerca de las enzimas purificadas del mezcal de levaduras no-*Saccharomyces*, pero no hay ninguna información sobre las propiedades bioquímicas de  $\beta$ -fructofuranosidasas de *T. delbrueckii* (Arrizon, Morel, Gschaedler, & Monsan, 2012).



**Figura 7** Levadura *Torulaspora delbrueckii* vista a microscopio con objetivo 40x.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Debido al alto interés de la industria alimenticia por los fructooligosacáridos se han buscado nuevas enzimas con capacidad catalítica de síntesis de FOS, así como la respectiva optimización de su aplicación en procesos enzimáticos constituye una ventaja tecnológica, previo a la optimización de los procesos enzimáticos, es necesaria la purificación y la caracterización bioquímica de las enzimas.

Arrizon y colaboradores en 2012, en el estudio realizado en 50 levaduras no-*Saccharomyces* aisladas de mezcal observaron que *T. delbrueckii*, *K. marxianus* y *C. apicola* presentaron actividad fructosiltransferasa. Santos y Maugeri en 2007 reportaron que *K. marxianus* es capaz de llevar a cabo reacciones de transfructosilación, pero para las cepas de *T. delbrueckii* y *C. apicola* fue la primera vez que se reportó que son productoras de enzimas con actividad fructosiltransferasa, las cuales hasta la fecha no han sido purificadas ni caracterizadas bioquímicamente (Gomez, Tuohy, Gibson, Klinder, & Costabile, 2009; Maugeri & Hernalsteens, 2007).

Por lo que en este trabajo se pretende purificar y caracterizar bioquímicamente una fructanasa producida por la levadura *Torulaspora delbrueckii* tanto en reacciones de hidrólisis de fructanos como de síntesis de FOS.

### 3. HIPÓTESIS

La purificación y caracterización de una nueva  $\beta$ -fructofuranosidasa con actividad fructosiltransferasa producida por la levadura *Torulaspora delbrueckii*, permitirá obtener nuevos conocimientos sobre el desplazamiento del equilibrio de reacción de hidrólisis hacia la síntesis enzimática de fructooligosacáridos a altas concentraciones de sacarosa.

## 4. OBJETIVO GENERAL

Purificar y caracterizar bioquímicamente una  $\beta$ -fructofuranosidasa con actividad fructosiltransferasa producida por la levadura *Torulaspora delbrueckii*, tanto en reacciones de hidrólisis de fructanos como de síntesis de fructooligosacáridos (FOS).

### 4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Realizar pruebas de afinidad de la  $\beta$ -fructofuranosidasa producida por *Torulaspora delbrueckii* con diferentes resinas (aniónicas, catiónicas, hidrofóbicas) para la selección de la más adecuada como primera etapa de purificación.
- ii. Purificar la  $\beta$ -fructofuranosidasa de *Torulaspora delbrueckii* por técnicas cromatográficas con apoyo de un FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) y evaluar la banda responsable de la actividad mediante zimogramas, así como su pureza y masa molecular por electroforesis SDS-PAGE para enviar a secuenciar la banda de la enzima y conocer su región N-terminal.
- iii. Determinar el pH óptimo y la temperatura óptima en la actividad de la  $\beta$ -fructofuranosidasa, evaluar su termoestabilidad y obtener los parámetros catalíticos ( $V_{\max}$ ,  $K_m$ ,  $K_{\text{cat}}$ ) tanto en reacciones de hidrólisis de fructanos, como de síntesis de fructooligosacáridos.
- iv. Optimizar la síntesis enzimática de fructooligosacáridos con la enzima purificada mediante un diseño superficie de respuesta.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 MATERIALES

La levadura *Torulaspora delbrueckii* (DN1) pertenece a la colección de cultivos del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología del Estado de Jalisco (Guadalajara, México). Inulina y Sacarosa fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Los Fructanos de Agave se compraron a CEASA, México. Todos los demás productos químicos fueron grado reactivo.

### 5.2 CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE EXTRACTO ENZIMÁTICO

Para reactivar la cepa que se encuentra a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  se tomó un vial y se inoculó en 100 ml de medio YPD (extracto de levadura  $10\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , peptona  $20\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , dextrosa  $20\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), se incubó en matraces Erlenmeyer a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  (250 rpm, 24 h). De este matraz se inocularon  $2\times 10^6$  células  $\cdot\text{ml}^{-1}$  en medio mineral (urea  $8\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $\text{K}_2\text{PO}_4$   $2\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $3\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , se esterilizó a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 min) con una solución de Fructanos de Agave ( $50\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  se esterilizó a  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 min), se incubaron a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  (250 rpm, 48 h). La biomasa se separó por centrifugación (6000 rpm,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 20 min) y el extracto enzimático (sobrenadante) se filtró a 0.45 micras, para eliminar las partículas y residuos celulares.

### 5.3 PURIFICACIÓN ENZIMÁTICA

El extracto enzimático (1 L) se diafiltró a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  en una membrana de nitrocelulosa de 10 kDa (buffer Tris-HCl, 20 mM, pH 7,8) y se concentró por filtración forzada con nitrógeno. El extracto concentrado (40 ml) se aplicó a una columna de intercambio aniónico (QFF HiPrep 16/10), previamente equilibrada con el mismo buffer. La proteína se eluyó con 2

volúmenes de columna de un gradiente lineal de 0-1 M de NaCl con un flujo de  $5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Las fracciones activas en sacarosa se colectaron y se concentraron a 1 ml, para posteriormente inyectarse a una columna de filtración en gel (Superdex 200) para separar la fructanasa y estimar el peso molecular de la enzima purificada por cromatografía de exclusión de tamaño.

La columna fue equilibrada con NaCl 150 mM en buffer Tris-HCl 20 mM, pH 7,5 a un flujo de  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . La pureza de la enzima fue verificada por análisis de SDS-PAGE. La enzima purificada se almacenó a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### **5.4 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA**

Se utilizaron diferentes sustratos para determinar la actividad enzimática con sacarosa, fructanos de agave, inulina o levano a una concentración de  $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  en una solución tampón de acetato a pH 5.0, y se siguió el protocolo reportado por (Arrizon, et al., 2012).

#### **5.5 DETERMINACIÓN DE ÓPTIMO PH, TEMPERATURA Y TERMO-ESTABILIDAD**

El pH óptimo se determinó para diferentes sustratos (sacarosa, inulina y fructanos de agave) mediante la medición de actividad fructanasa a temperatura constante ( $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y diferentes pH: 3.5 a 6.0 (100 mM de buffer acetatos), 6.0-7.0 (100 mM buffer de citrato) y 7.0-9.0 (20mM Tris-HCl). La temperatura óptima se determinó para cada sustrato mediante la medición de actividad fructanasa a diferentes temperaturas (30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 y  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ ). En el caso de la estabilidad térmica, para cada sustrato la enzima se incubó a pH óptimo y diferentes temperaturas (30, 40, 45 y 50, 55 y  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ ), se midió la actividad residual a través del tiempo.

## 5.6 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS

Se prepararon diferentes soluciones al pH óptimo para cada sustrato (Sacarosa 0.25-16 % p / v, inulina 0.2-2 % p / v, fructanos de agave 0.25-4 % p / v) y la actividad enzimática fue medida a temperatura óptima. Se graficó la concentración de sustrato contra la velocidad de reacción para obtener el grafico de Michaelis-Menten, el cual fue linealizado mediante la ecuación de Lineweaver-Burk para determinar la  $K_m$  (mM) y  $V_{max}$  ( $U \cdot ml^{-1}$ ). La constante catalítica  $K_{cat}$  ( $s^{-1}$ ) fue calculada considerando la concentración de enzima y un peso molecular teórico de 416 kDa el cual fue calculado por cromatografía de exclusión de tamaño.

## 5.7 EFECTO DE LOS IONES SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

El efecto de los iones sobre la actividad enzimática fue determinada sobre sacarosa ( $10 g \cdot l^{-1}$ ), a esta solución de sacarosa se le adicionaron iones a 20 mM ( $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ag^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ) y la actividad fue determinada a temperatura óptima con y sin iones.

## 5.8 COMPARACIÓN DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA ENZIMA PURIFICADA CONTRA ENZIMAS COMERCIALES

Una solución de  $50 g \cdot l^{-1}$  de diferentes sustratos (sacarosa, inulina y fructanos de agave) fueron preparadas en el pH óptimo de cada sustrato para la enzima purificada de *T. delbrueckii*, el cual es similar al rango de pH de las enzimas comerciales (4.5-5.5). Después 9.5 ml de la solución de sustrato fue mezclada con 0.5 ml de una dilución adecuada para llegar a una velocidad inicial de  $0.05 U \cdot ml^{-1}$  para cada sustrato.

Tres enzimas comerciales se utilizaron para la comparación: Fructozyme (Novozymes), Invertasa 1 (invertasa S, EC 3.2.1.26, ENMEX,) e Invertasa 2 (invertasa EC 3.2.1.26,



SIGMA). La hidrólisis enzimática se llevó a cabo a 40 °C durante 48 h. Se tomaron muestras a 0, 3, 6, 9, 12, 24 y 48 horas para seguir la liberación de azúcares reductores, que se determinó mediante DNS.

## 5.9 SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE FOS USANDO UNA METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

Se realizó un diseño de superficie de respuesta con dos puntos al centro, para estudiar el efecto del pH (5.5-7.5) y la relación sustrato enzima (0.6-1.8) sobre la síntesis de FOS a temperatura constante (45 °C), la serie de experimentos desarrollados se muestran en la Tabla 5. Los experimentos fueron realizados en un incubador rotatorio Envirogenie y a una concentración de sacarosa inicial de 700 g•l<sup>-1</sup> en un volumen de 5 ml. Las reacciones fueron analizadas en un HPLC Agilent 1220 con un detector de índice de refracción (IR) Agilent 1260, empleando la columna Aminex (HPX-87C, 250 x 4 mm, BioRad). El diseño fue analizado utilizando Statgraphics Centurion XVI.

**Tabla 5** Condiciones de pH y relación Sustrato/Enzima (S/E) para cada experimento del diseño superficie de respuesta

Experimento	pH	S/E
1	5.50	0.60
2	7.50	0.60
3	5.50	1.80
4	7.50	1.80
5	5.09	1.20
6	7.91	1.20
7	6.50	0.35
8	6.50	2.05
9	6.50	1.20
10	6.50	1.20

## 6. RESULTADOS

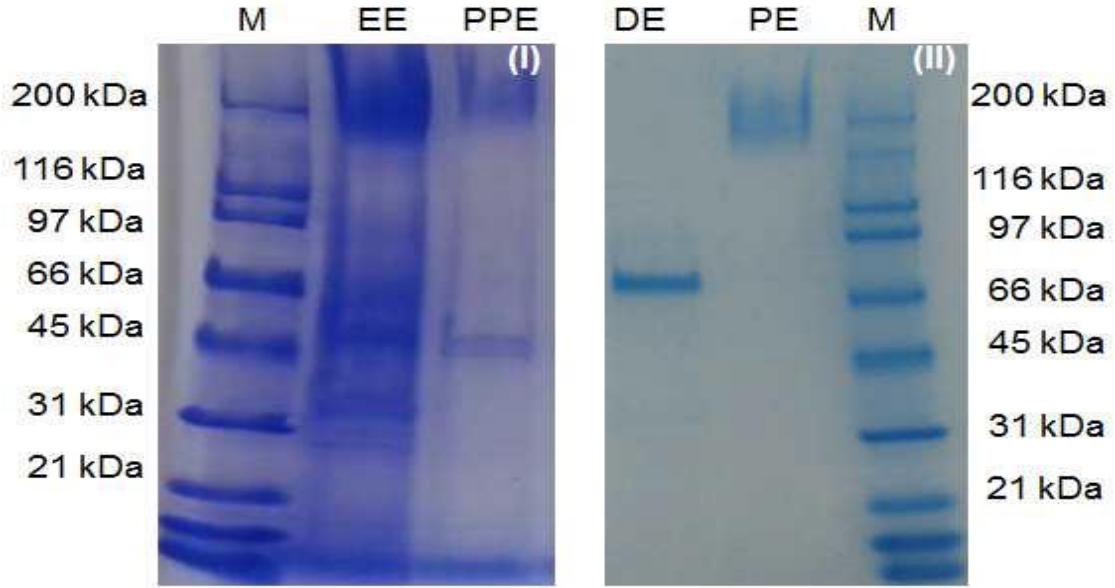
### 6.1 PURIFICACIÓN DE LA $\beta$ -FRUCTOFURANOSIDASA DE *T. delbrueckii*

La enzima fue purificada con un factor de purificación de 8.9 y un rendimiento de 8.5 % (Tabla 6), el peso molecular observado de la proteína nativa fue de 416 kDa, el cual fue determinado mediante cromatografía de exclusión de tamaño (Figura 9), este peso molecular es mayor al de la mayoría de enzimas similares reportadas (Tabla 4). La purificación fue seguida mediante SDS-PAGE en donde se logró obtener una banda de un peso aproximado de 200 kDa que presentó un barrido el cual es característico de proteínas hiperglicosiladas. A la enzima pura se le aplicó un tratamiento para deglicosilar y se obtuvo una banda de 70 kDa (Figura 8), por lo que podemos decir que la enzima purificada se trata de un dímero con un porcentaje de glicosilación aproximadamente de 65 %. El papel que juega la glicosilación dentro de la actividad enzimática ha sido reportado en una  $\beta$ -fructofuranosidasa aisladas de *Aureobasidium* sp. (Hayashi et al 1992; Hayashi et al 1994), pero en este caso se necesitan realizar más estudios para entender el papel de la glicosilación en esta enzima.

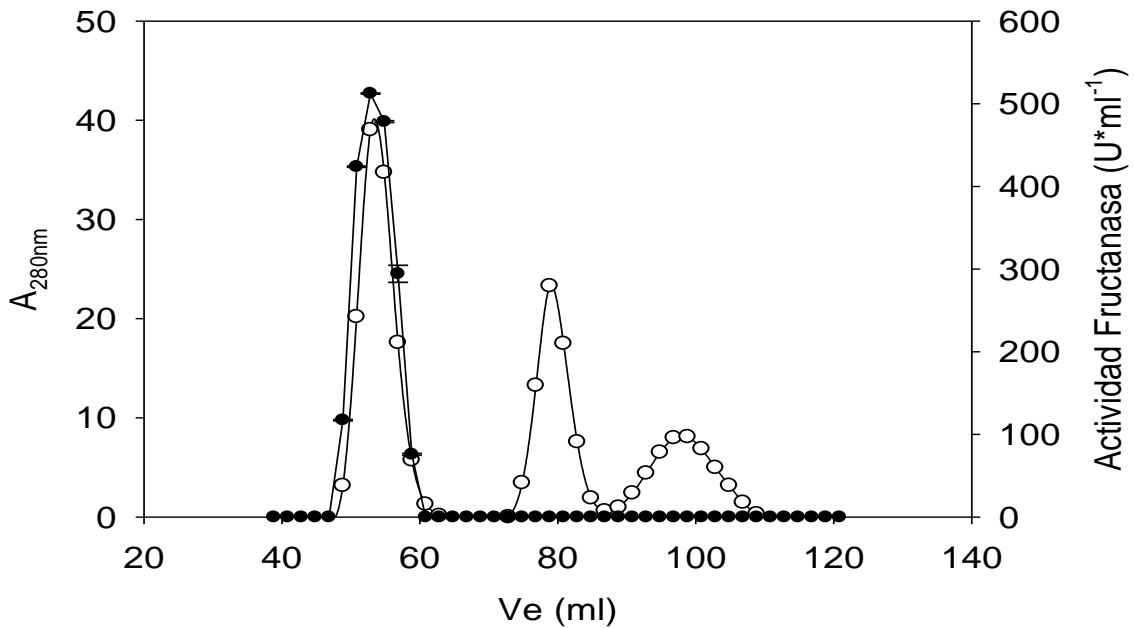
**Tabla 6** Tabla de purificación enzimática de la  $\beta$ -fructofuranosidasa de *T. delbrueckii*

<b>Paso</b>	<b>Actividad Total (U)</b>	<b>Proteína Total (mg)</b>	<b>Actividad Especifica (U•mg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>	<b>Factor de Purificación</b>
<b>1</b>	44428.12	101.61	437.24	100.00	1.00
<b>2</b>	40762.50	20.41	1997.18	91.75	4.57
<b>3</b>	6342.63	2.60	2437.43	14.28	5.57
<b>4</b>	3786.35	0.98	3880.50	8.52	8.88

1: Extracto crudo. 2: Extracto concentrado. 3: Columna anionica Q FF. 4: Superdex 200



**Figura 8** Gel SDS-PAGE de la purificación parcial (I) y de la enzima pura (II). M (Marcador de peso molecular), EE (Extracto enzimático), PPE (Purificación parcial), PE (Enzima Pura), DE (Enzima Deglicosilada). Tinción con azul de Coomassie.



**Figura 9** Cromatografía de exclusión Superdex G-200. A<sub>280 nm</sub> (○), Actividad fructanasa (●).

## 6.2 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA $\beta$ -FRUCTOFURANOSIDASA PURIFICADA APARTIR DE *T. delbrueckii*

### 6.2.1 TERMO-ESTABILIDAD, PH Y TEMPERATURA ÓPTIMOS

La enzima purificada de *T. delbrueckii* mostró actividad máxima pH 5 y a una temperatura de 45 °C para inulina (Figura 10-13), para FA pH 4.5 y temperatura de 45 °C (Figura 11-14), para sacarosa pH 5.5 y temperatura de 40°C (figura 11-15). Estos parámetros se resumen en la Tabla 7, así como su respectiva termo-estabilidad. El pH óptimo para enzimas reportadas son similares, una exo-inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* pH óptimo de 4.5-5.5 (Arrizon, et al., 2011), una inulinasa de *Streptomyces* sp. pH óptimo 5.5 (Dey & Agarwal, 1999), una inulinasa de *Rhizopus* sp. pH óptimo 5.5 (Ohta, Suetsugu, & Nakamura, 2002). La temperatura óptima se encontró a 45 °C tanto para la inulina y Fructanos de Agave, mientras que para sacarosa la temperatura óptima fue de 40 °C. Enzimas similares han sido reportadas que tienen temperaturas óptimas en un amplio rango de temperatura (45 - 75 °C), (Álvaro-Benito, et al., 2007; Andjelković, et al., 2010; Chen, et al., 2011; Hernalsteens & Maugeri, 2008a).

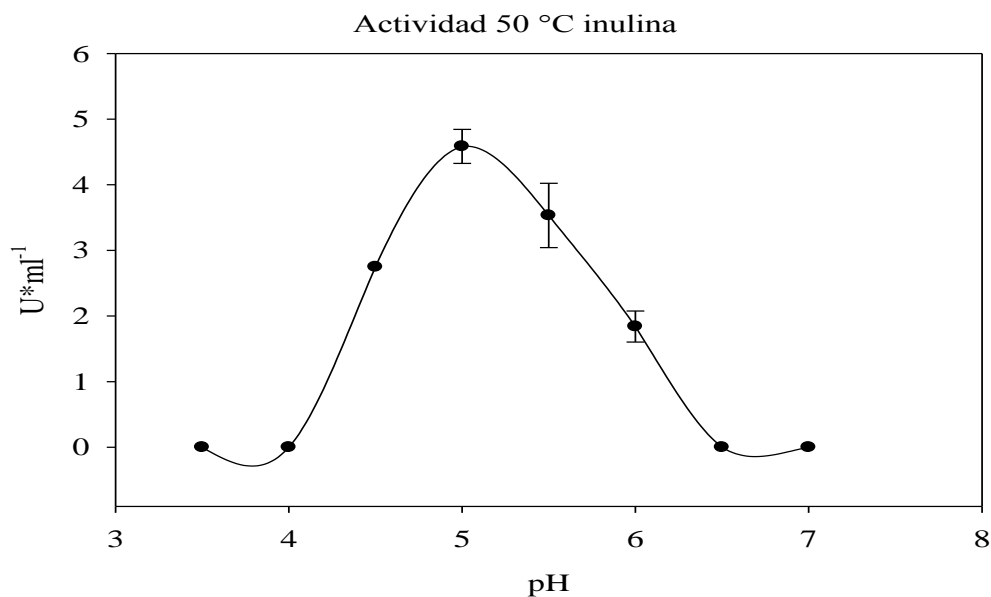
**Tabla 7** Temperatura y pH óptimos para la fructanasa purificada de *T. delbrueckii*.

Sustrato	pH óptimo	T (°C) óptima	Termo-estabilidad (°C)
<b>Inulina</b>	5 (56.61)*	45 (92.84)*	30 (44)**
<b>Fructanos</b>	4.5 (783.39)*	45 (203.80)*	30 (46.3)**
<b>Sacarosa</b>	5.5 (4208.24)*	40 (3990.18)*	30 (56.4)**

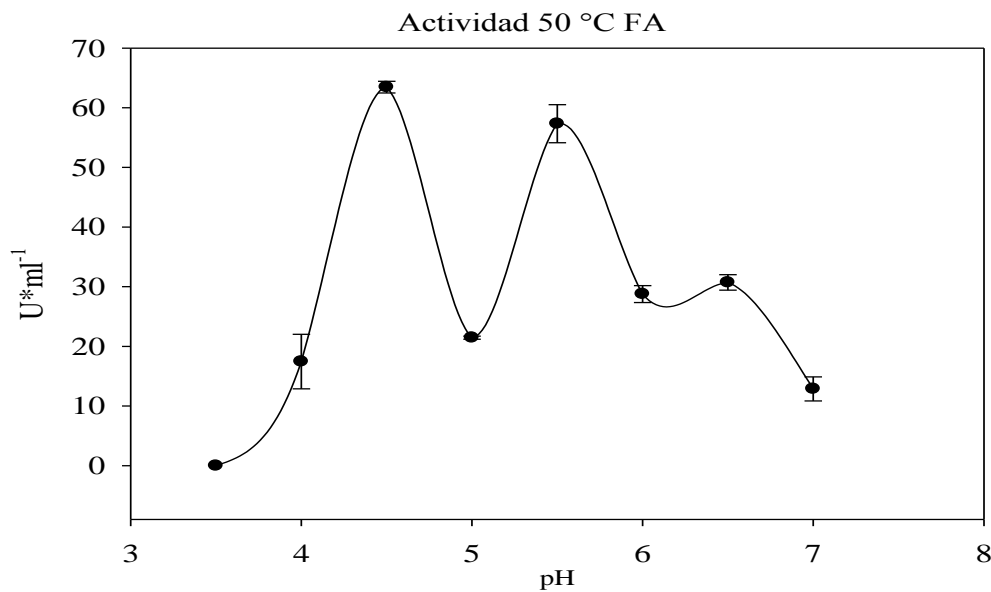
\*Máxima actividad específica (U/mg). \*\* Porcentaje de actividad residual (%) a 9 horas de reacción.

Para los tres sustratos la actividad residual después de 9 horas de incubación a 30 °C fue similar como se muestra en la Tabla 7. La más alta actividad residual fue de 56%, cuando se utilizó sacarosa como sustrato. La actividad enzimática se perdió completamente a 45 °C después de 3 horas de incubación y toda la actividad se perdió en una hora a 50 °C. Se necesita realizar más investigación para entender el papel de la glicosilación en esta

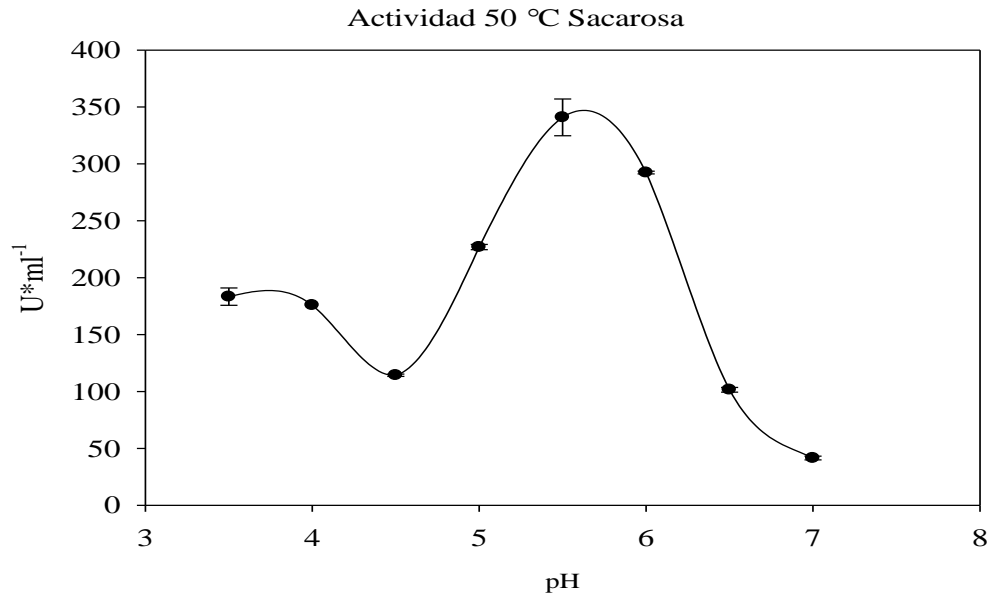
fructanasa ya que podría ser necesario para que la enzima sea activa, pero no ofrece buenas propiedades de estabilidad térmica.



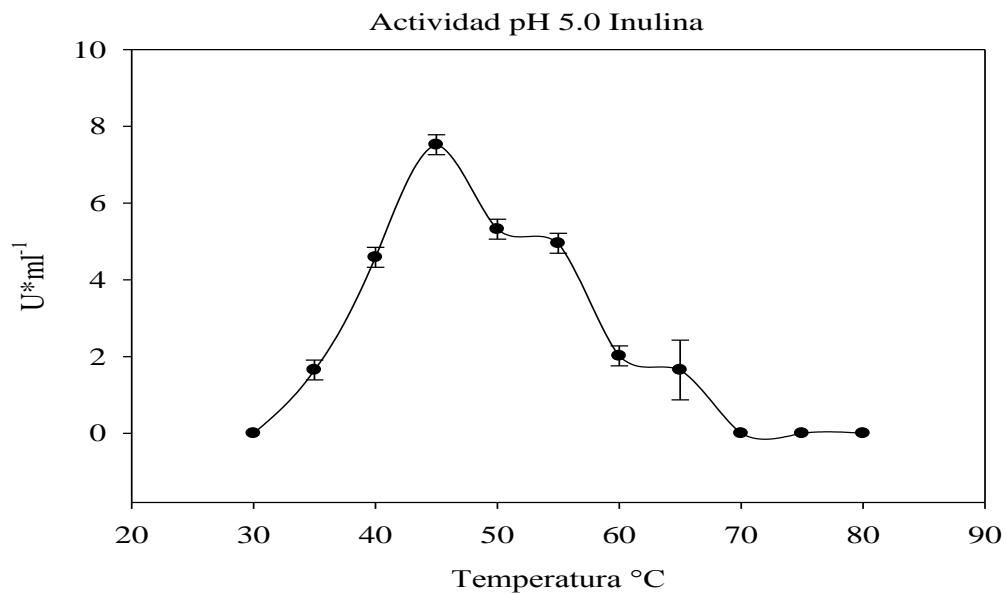
**Figura 10** Efecto de pH sobre la actividad enzimática utilizando inulina como sustrato, de la enzima purificada a partir de *T. delbrueckii*.



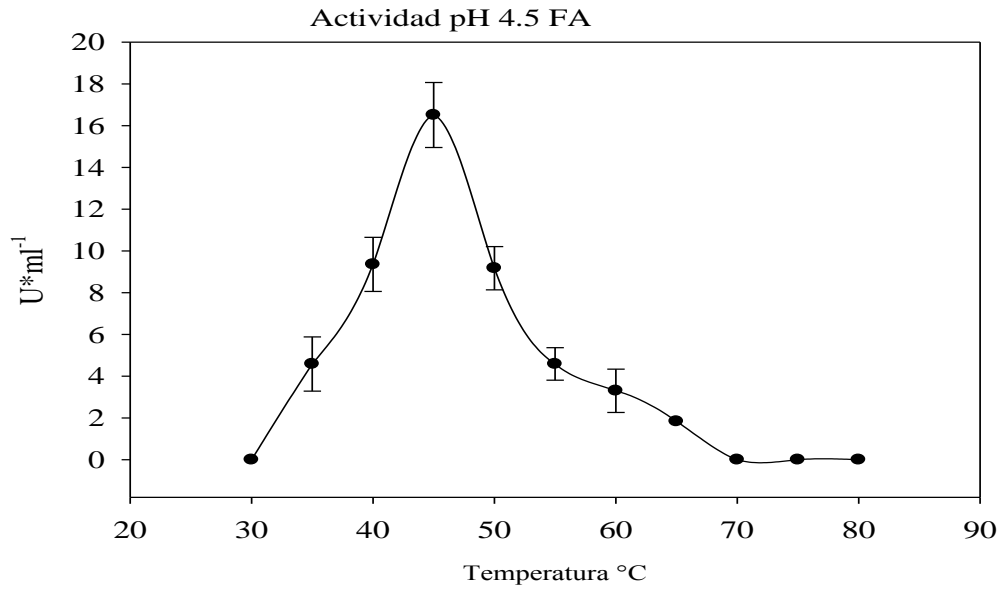
**Figura 11** Efecto de pH sobre la actividad enzimática utilizando fructanos de agave como sustrato, de la enzima purificada a partir de *T. delbrueckii*



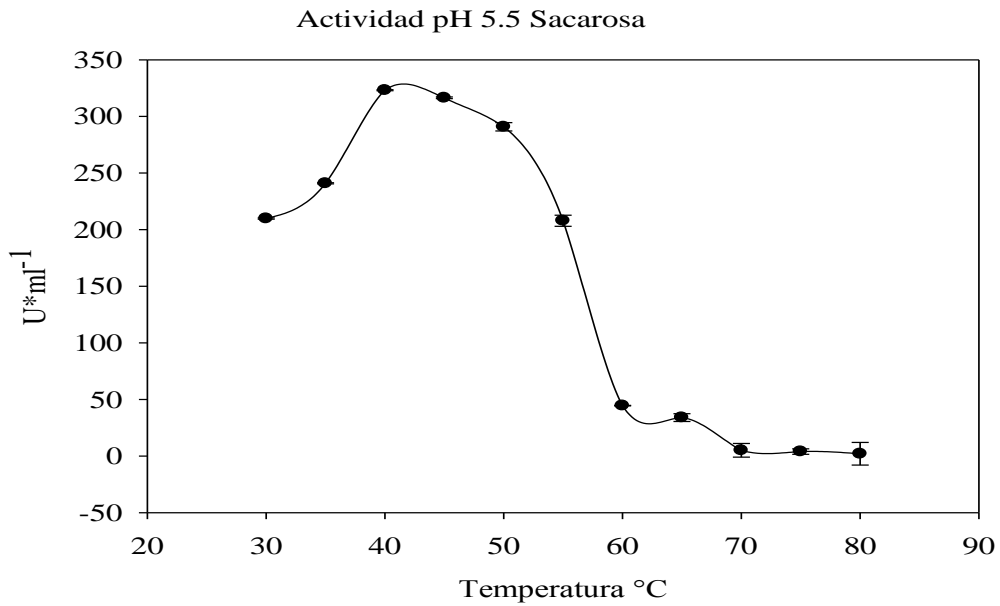
**Figura 12** Efecto de pH sobre la actividad enzimática utilizando sacarosa como sustrato, de la enzima purificada a partir de *T. delbrueckii*



**Figura 13** Efecto de temperatura a pH 5.0 sobre la actividad enzimática utilizando inulina como sustrato, de la enzima purificada a partir de *T. delbrueckii*



**Figura 14** Efecto de temperatura a pH 4.5 sobre la actividad enzimática utilizando fructanos de agave como sustrato, de la enzima purificada a partir de *T. delbrueckii*



**Figura 15** Efecto de temperatura a pH 5.5 sobre la actividad enzimática utilizando sacarosa como sustrato, de la enzima purificada a partir de *T. delbrueckii*

### 6.2.2 PARÁMETROS CINÉTICOS

Para todos los sustratos, la fructanasa producida por *T. delbrueckii* siguió la cinética de Michaelis-Menten y los datos experimentales se ajustaron al modelo de Lineweaver-Burk y los parámetros cinéticos se calcularon con coeficientes de regresión cerca de 1 (Tabla 8). Si se tomara como referencia a  $K_m$  para elegir el sustrato de mayor afinidad, los fructanos de agave son aquellos por el cual la enzima tiene mayor afinidad, sin embargo, esto no es correcto porque la eficiencia catalítica ( $k_{cat} / K_m$ ) fue mayor para la sacarosa ( $1289,99 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ), lo cual puede explicarse por una mayor afinidad por sacarosa como sustrato para la hidrólisis (Álvaro-Benito, et al., 2007).

**Tabla 8** Parámetros cinéticos de la fructanasa extracelular purificada a partir de *T. delbrueckii*

Sustrato	Peso molecular (kDa)	$V_{max}$ ( $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	$K_m$ (mM)	$K_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_{cat}/K_m$ ( $\text{s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ )	$R^{2v}$
Inulina	5000 <sup>1</sup>	13.81	3.65	1211.59	331.77	0.98
Fructanos	2690 <sup>1</sup>	34.01	3.63	2983.64	821.34	0.99
Sacarosa	342 <sup>1</sup>	454.55	30.91	39872.41	1289.99	0.99

<sup>1</sup>Peso Molecular promedio.

<sup>v</sup> Coeficiente de regresión de la ecuación de Lineweaver–Burk.

El hecho de que esta fructanasa tenga una actividad hidrolítica superior sobre sacarosa y los oligosacáridos de cadena corta, indica que la fructanasa producida por *T. delbrueckii* puede ser una exo-hidrolasa y por lo tanto presenta una baja actividad en fructanos de cadena larga.

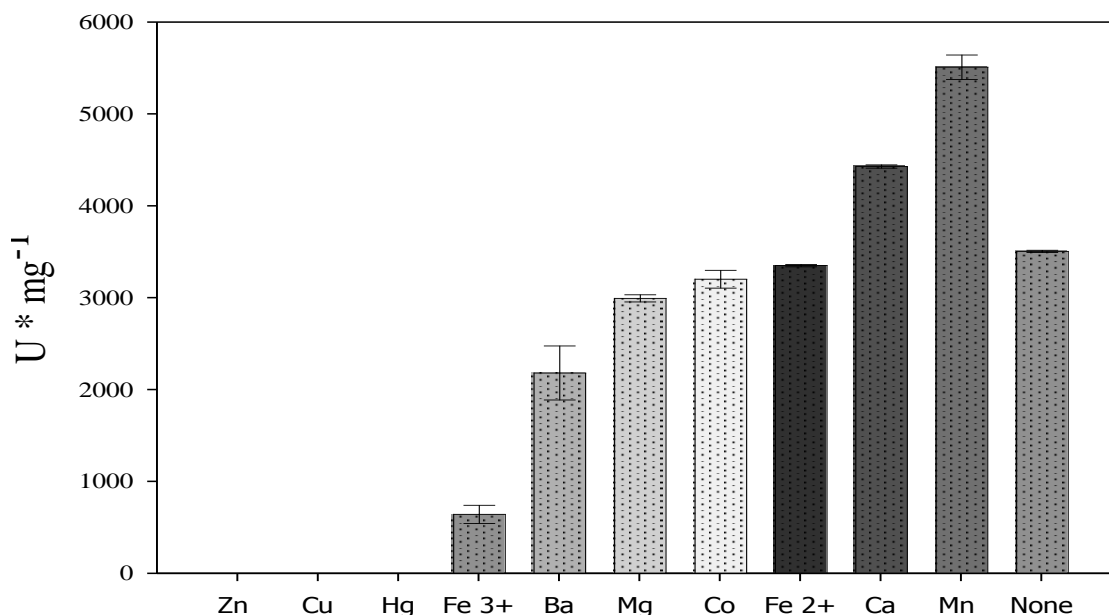
Una alta constante catalítica sobre sacarosa no es común en fructanasas, pero puede ser comparado con otras enzimas, como una invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* ( $k_{cat} =$



$9.43 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ ) (Reddy & Maley, 1996) y una  $\beta$ -fructofuranosidasa de *Rhodotorula dairenensis* ( $k_{\text{cat}} = 6.5 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ ) (Gutiérrez-Alonso, et al., 2009).

### 6.2.3 EFECTO DE LOS IONES SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA $\beta$ -FRUCTOFURANOSIDASA DE *T. delbrueckii* EMPLEANDO SACAROSA

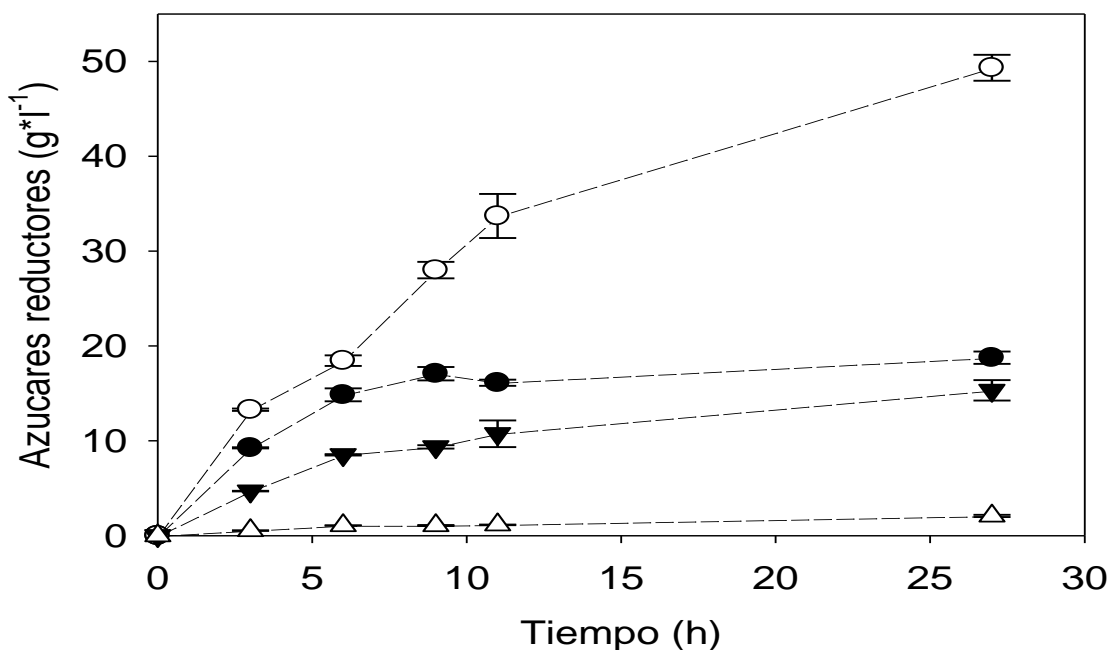
Midiendo actividad enzimática sobre sacarosa con diferentes iones, algunos activaron a la enzima y otros la reprimieron (Figura 16).  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+2}$  tuvieron un efecto negativo disminuyendo la hidrólisis de sacarosa,  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mn}^{+2}$  tuvieron un efecto positivo al aumentar la actividad hidrolítica, lo que corresponde con los resultados reportados con una fructosiltrasferasa de *Aspergillus aculeatus* que se vio afectada negativamente por  $\text{Zn}^{+2}$  y positivamente por  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mn}^{+2}$  (Ghazi et al., 2007). Una fructofuranosidasa producida por *Xanthophylomyces dendrorhous* se vio afectada negativamente por  $\text{Zn}^{+2}$  reduciendo su actividad enzimática a 86%, pero a diferencia de la fructanasa estudiada en este trabajo, la actividad no se pierde por completo (Chen, et al., 2011).



**Figura 16** Efecto de los iones sobre la hidrólisis de sacarosa por la fructanasa extracelular de *T. delbrueckii*.

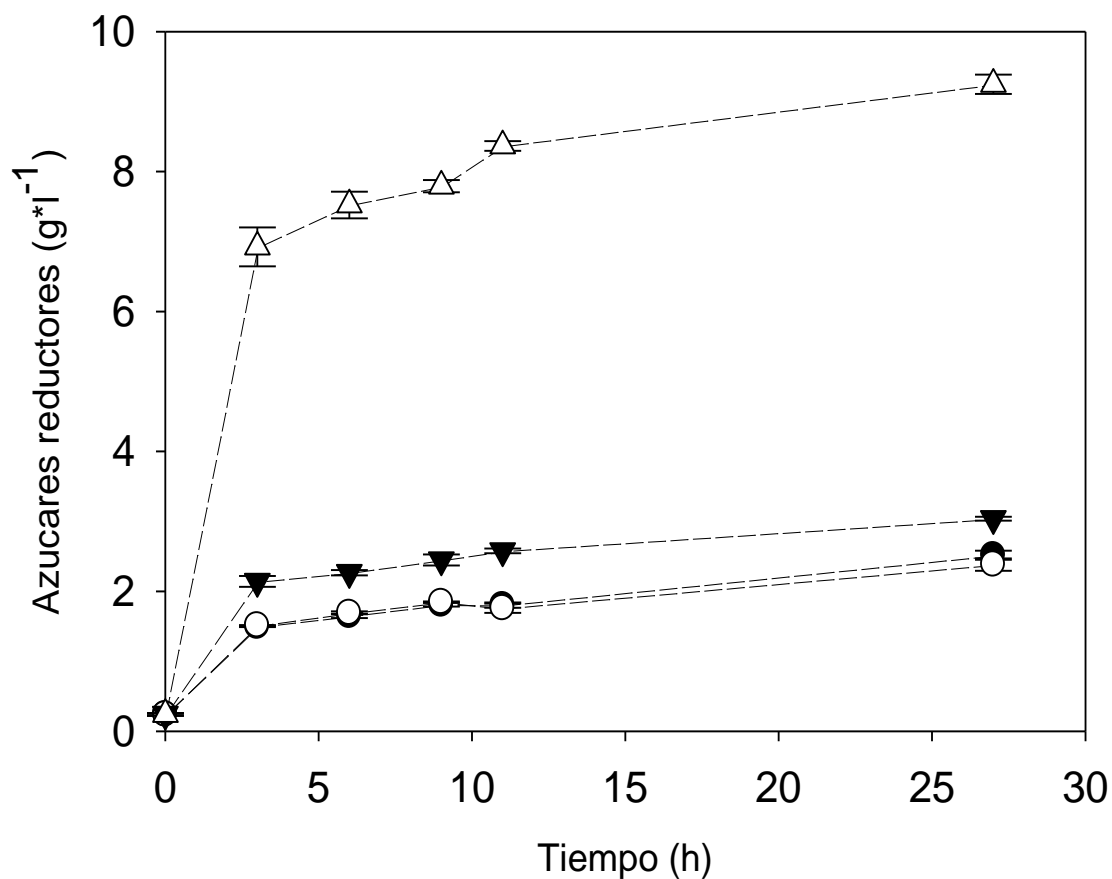
#### 6.2.4 COMPARACIÓN DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA $\beta$ -FRUCTOFURANOSIDASA PURIFICADA CONTRA ENZIMAS COMERCIALES

De acuerdo con la inducción de la enzima y la caracterización bioquímica de la fructanasa producida por *T. delbrueckii*, está comparte algunas propiedades catalíticas con fructanasas e invertasas, por tanto, una comparación con los dos tipos de enzimas se llevó a cabo en sustratos adecuados, la inulina y ATF para fructanasas y sacarosa para invertasas. Para todas las enzimas se aplicó la misma velocidad de hidrólisis inicial sobre cada sustrato (0,05 U / ml). La comparación se muestra en la Figura 17. En las condiciones ensayadas Fructozyme no fue eficaz para la hidrólisis de sacarosa mientras que Inv 1 mostró la tasa de hidrólisis más alta seguido por Inv 2, y la de *T. delbrueckii* tuvo la velocidad de hidrólisis más baja con un patrón similar al Inv 1 (Figura 17).

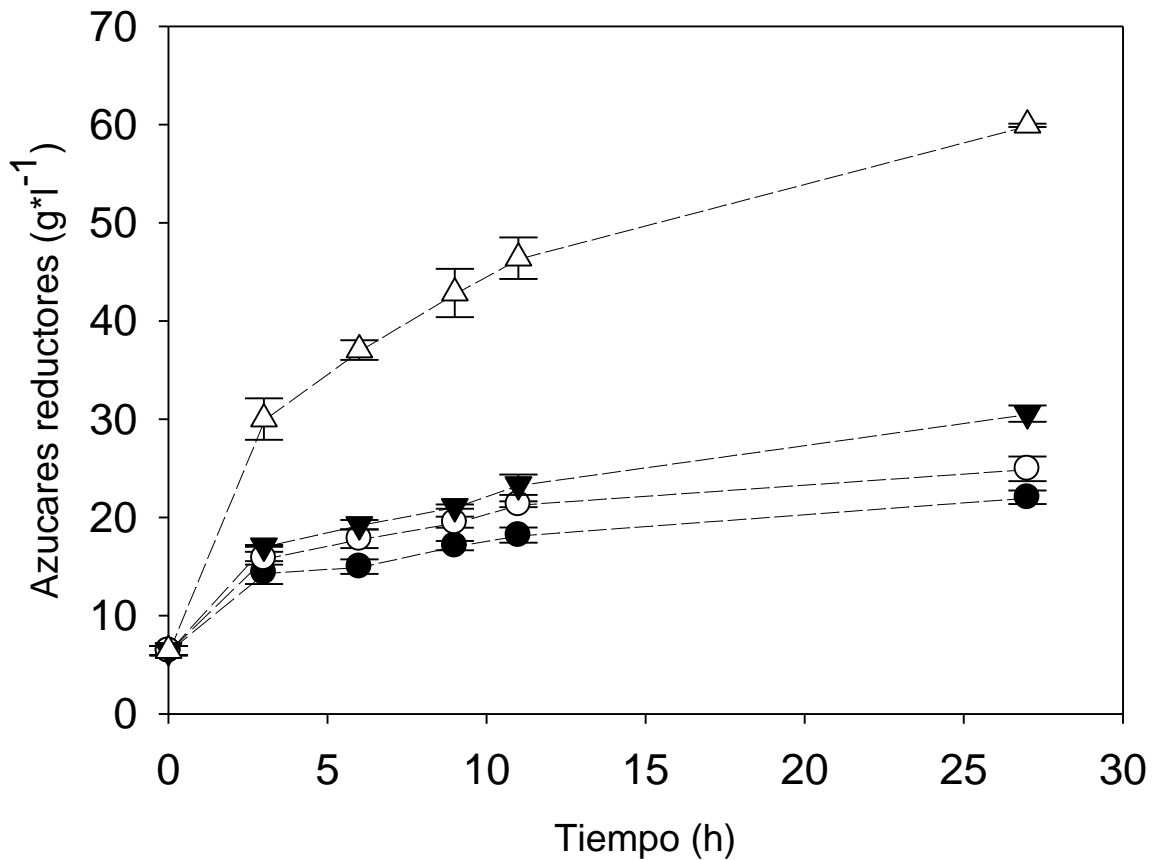


**Figura 17** Comparación de hidrólisis enzimática sobre Sacarosa, seguidos por DNS con *T. delbrueckii* (▼), Invertasa 1(●), Invertasa 2 (○), y Fructozyme (Δ).

En el caso de la inulina y ATF se observó el comportamiento opuesto (Figura 18 y 19 respectivamente); Fructozyme fue la enzima más eficaz, mientras que la fructanasa purificada mostró un patrón de hidrólisis similar a las enzimas Inv 1 y 2 en ambos sustratos con un ligero aumento en la velocidad de hidrólisis. Las tres enzimas mostraron la más alta tasa de hidrólisis en las primeras 5-10 horas.



**Figura 18** Comparación de hidrólisis enzimática sobre inulina, seguidos por DNS con *T. delbrueckii* (▼), Invertasa 1 (●), Invertasa 2 (○), y Fructozyme (Δ).



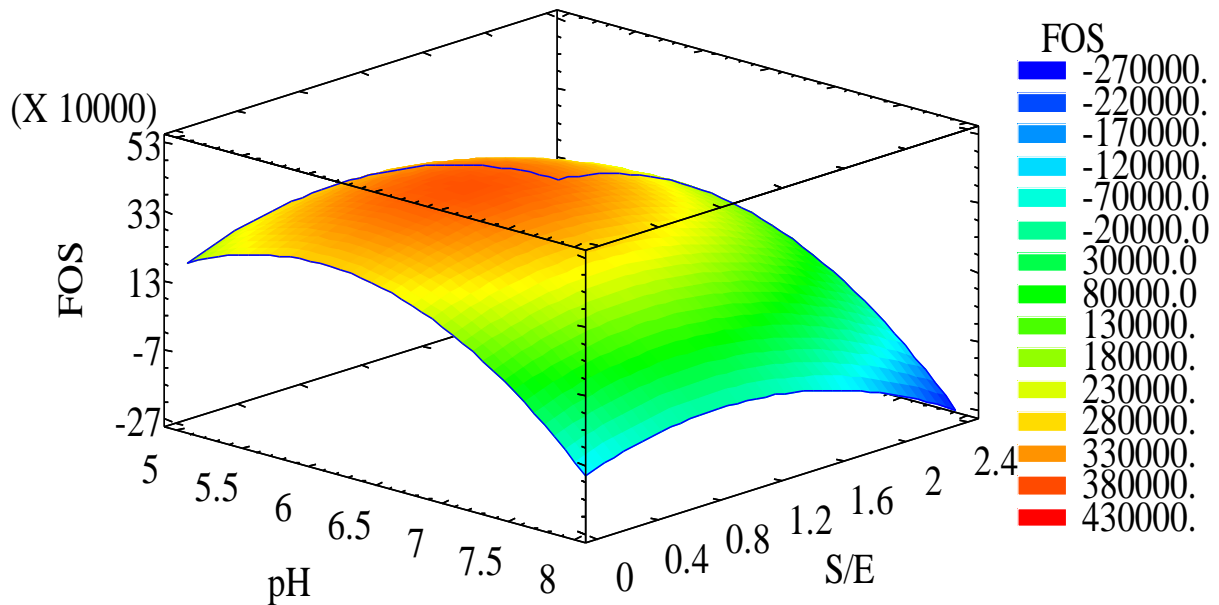
**Figura 19** Comparación de hidrólisis enzimática sobre Fructanos de agave, seguidos por DNS con *T. delbrueckii* (▼), Invertasa 1 (●), Invertasa 2 (○), y Fructozyme (Δ).

En el caso de la fructanasa purificada, este comportamiento es normal ya que su temperatura óptima es de 40-45 °C y pierde 44 a 56.4% de la actividad en las primeras 9 horas a 30 °C. Como se puede observar, la enzima purificada de *T. delbrueckii* es una fructanasa no inducida por la sacarosa, pero bioquímicamente comparten características comunes con invertasas.

De acuerdo con los proveedores, las invertasas comerciales fueron producidas por *S. cerevisiae*. Por lo tanto, la estructura de la fructanasa de *T. delbrueckii* podría ser similar a una invertasa de *S. cerevisiae*. Esto podría ser posible porque hay una proximidad filogenética de *S. cerevisiae* con *T. delbrueckii* (Kurtzman, Fell, & Boekhout, 2011).

### 6.3 SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE FOS USANDO UNA METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

A pesar de que en estudios previos se encontró que la enzima purificada de *Torulaspora delbrueckii* tiene una alta actividad hidrolítica sobre sacarosa con una  $k_{cat} = 3.9 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$  (Trujillo, Ordaz, Rodríguez, Amaya-Delgado, & Arrizon, 2014), la enzima fue capaz de realizar reacciones de transfructosilación a alta concentración de sacarosa. De manera preliminar se encontró que esta enzima presenta mayor actividad de transfructosilación a 45 °C y una concentración de sacarosa inicial de 700 g/l, por lo que estos factores se mantuvieron constantes. Los dos factores variados fueron pH (5.5-7.5) y relación S/E (0.6-1.8). El modelo estadístico de superficie de respuesta ( $p < 0.05$ ,  $R^2 = 0.95$ ), nos predijo un pH de 5.97 y una relación S/E de 0.95 (figura 20).

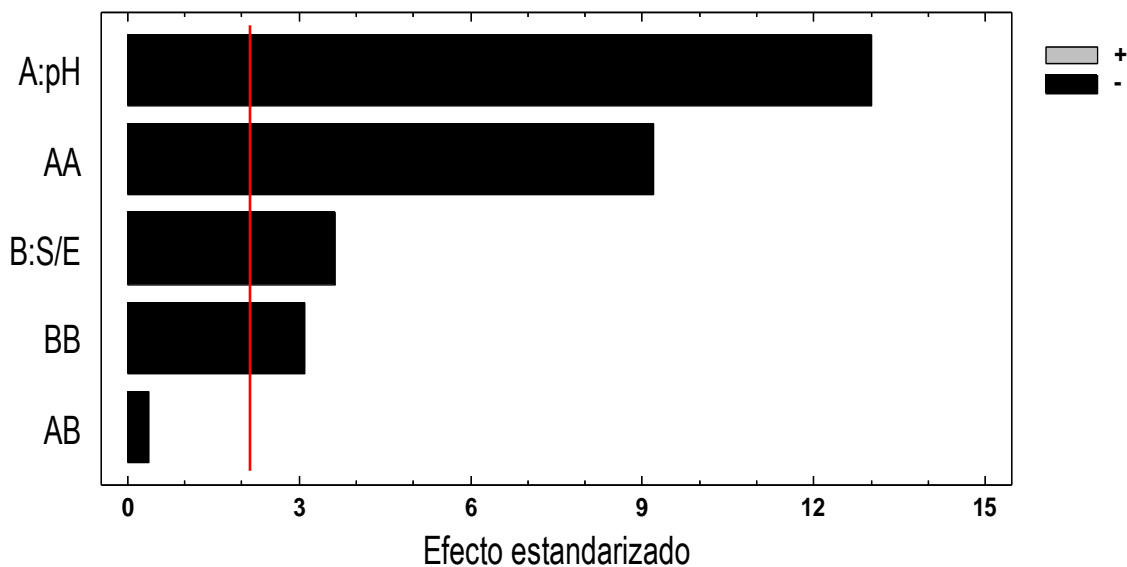


**Figura 20** Superficie de respuesta estimada en área de pico cromatográfico de FOS en función de pH y relación S/E, después de 84 horas de reacción.

$$(FOS = -3.38663E6 + 1.22171E6 * pH + 224812. * S/E - 101672. * pH^2 - 7312.5 * pH * S/E - 94990.9 * S/E^2)$$

El diagrama de Pareto que se muestra en la Figura 21, indica que ambos factores son significativos en la síntesis de FOS, el pH mostró un mayor efecto significativo, a pH mayor a 7.0 la enzima ya no fue activa. Mientras que, en el rango de pH de 5.5. a 6.5 se observó el máximo de actividad. Estas condiciones son similares a las encontradas por otros autores en la síntesis de FOS, donde las temperaturas de reacción van desde 40-60 °C, el rango de pH de 5.5 a 6.5, la concentración inicial de sacarosa de 400-600 g/l tal como lo reportan en diferentes trabajos realizados con distintas levaduras (*Schwanniomyces occidentalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces Marxianus*, *Rhodotorula dairenensis*, *Cryptococcus* sp.) (Álvaro-Benito, et al., 2007; Andjelković, et al., 2010; Arrizon, et al., 2011; Gutiérrez-Alonso, et al., 2009; Hernalsteens & Maugeri, 2008b; Nemukula, et al., 2009).

Con anterioridad se determinó la temperatura óptima y pH óptimos de hidrólisis de sacarosa para la enzima purificada (40 °C y pH 5.5), por lo que se puede observar que la transfructosilación requiere un pH más cercano a la neutralidad y un incremento de temperatura para desplazar el equilibrio hacia la síntesis.



**Figura 21** Diagrama de Pareto para el efecto estandarizado

## 7. CONCLUSIONES

La  $\beta$ -fructofuranosidasa extracelular producida por *T. delbrueckii* en este trabajo purificada, presenta algunas propiedades catalíticas similares a exo-fructanhidrolasas producidas por *K. marxianus* así como similares características bioquímicas de invertasas producidas por *S. cerevisiae*, que podrían ser debido a la proximidad filogenética entre estas levaduras. Como *K. marxianus* y *T. delbrueckii* se han aislado del mismo proceso de fermentación antigua del mezcal, el origen de levaduras podría tener también una influencia sobre las propiedades de las enzimas purificadas. Por otro lado, fue posible desplazar el equilibrio de la reacción enzimática de hidrólisis hacia la transfructosilación de una  $\beta$ -fructofuranosidasa aislada de *Torulaspora delbrueckii* variando la proporción substrato/ enzima y el pH. Las mejores condiciones de producción de FOS se alcanzaron con pH de 5.9 y la relación S/E de 0.95 (g sacarosa / U $\cdot$ ml<sup>-1</sup>) con una concentración máxima de FOS de 30 g $\cdot$ L<sup>-1</sup> de FOS. Por lo tanto el producto resultante puede ser utilizado industrialmente como un edulcorante enriquecido con FOS. Para su utilización como edulcorante funcional, se requiere probar su actividad prebiótica *in vitro* o en simulador del tracto digestivo humano.

## 8. RECOMENDACIONES

Debido a que en este trabajo se purificó una enzima hiperglicosilada y no se conoce el papel que juega esta característica sobre la actividad enzimática, podría ser interesante encontrar el gen de codificación, luego compararlo con la secuencia de ADN, la secuencia del péptido y el patrón de glicosilación de estas enzimas ya que la enzima purificada de *T. delbrueckii* presenta cerca del 65 % en peso molecular de glicosilación y sería interesante estudiar el rol que juega la glicosilación en esta enzima.

Debido a que se trata de la primera vez que se purifica una enzima de *T. delbrueckii* sería muy importante llegar a publicar los resultados de esta investigación.

## 9. ANEXOS

### 9.1 ANEXO A. DETERMINACION DE PESO MOLECULAR UTILIZANDO COLUMNA SUPERDEX G 200

El peso molecular de una proteína desconocida puede determinarse mediante la curva de calibración ( $K_{av}$  frente al logaritmo de peso molecular) una vez que su valor  $K_{av}$  se calcule a partir de su volumen de elución con la siguiente formula:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

Donde:

$V_o$  (Volumen vacío columna)= 45 ml,

$V_t$  (volumen total de columna) = 120 ml

$V_e$  (volumen de elución)= 55ml

$$K_{av} = \frac{55 \text{ ml} - 45 \text{ ml}}{120 \text{ ml} - 45 \text{ ml}} = 0.1333$$

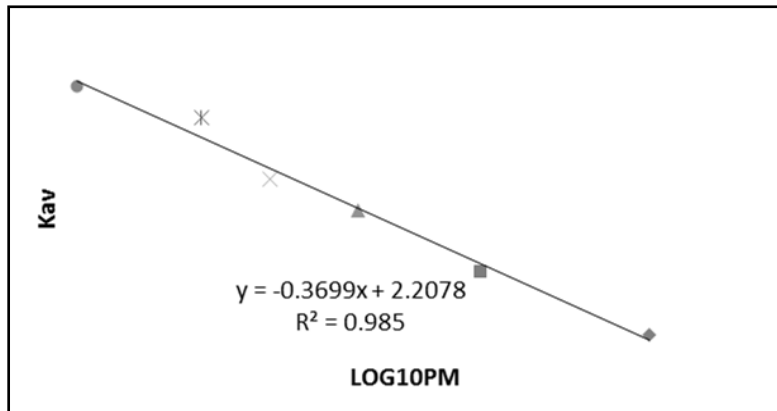
*Tabla 9 Datos para curva de calibración de la columna Superdex g-200 16/60*

<b>Proteína</b>	<b>Masa molecular (Da)</b>	<b>Volumen de elución (ml)</b>	<b>Kav</b>
<b>Blue dextran 2000</b>	2000000	45	0.00
<b>Ferritin</b>	440000	55	0.13
<b>Aldolase</b>	158000	65	0.27
<b>Conalbumin</b>	75000	75	0.40
<b>Ovoalbumin</b>	44000	80	0.47
<b>Carbonic anhydrase</b>	29000	90	0.60
<b>Ribonuclease A</b>	13700	95	0.67

Datos tomado del kit de calibración para la columna Superdex g-200 16/60

A partir de la tabla anterior se obtiene el siguiente gráfico:





**Figura 22** Curva de calibración  $K_{av}$  Vs  $\text{LOG}_{10}\text{PM}$

Despejando el  $\text{LOG}_{10}\text{PM}$

$$\log_{10} PM = \frac{K_{av} - 2.207}{-0.369}$$

Por lo tanto:

$$\log_{10} PM = \frac{0.133 - 2.207}{-0.369} = 5.6196$$

$$PM = 10^{(5.6197)}$$

Por lo tanto tenemos:

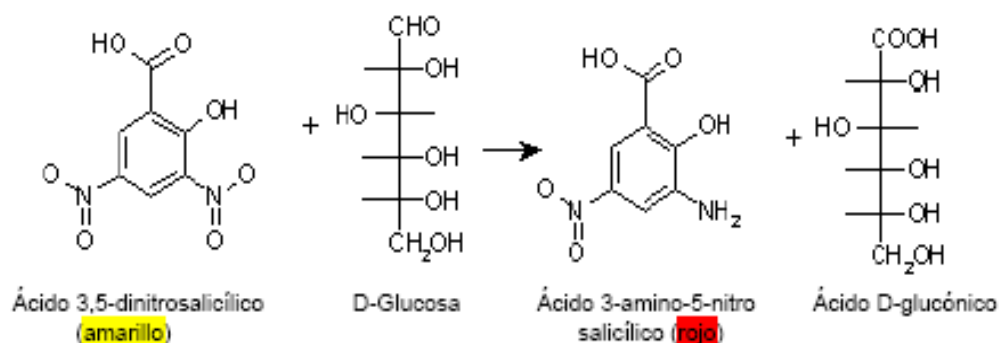
$$PM = 416574.81 \text{ Da}$$

De acuerdo a estos cálculos la proteína purificada a partir de *Torulaspora delbrueckii* tiene un peso molecular de 416.57 KDa

## 9.2 ANEXO B. CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR EL MÉTODO DEL ÁCIDO DINITROSALICÍLICO (DNS) (Miller G.L. 1959).

Este es un método preciso y rápido, útil en la determinación de azúcares reductores en solución. Sin embargo, la presencia de polifenoles ocasiona la reducción del reactivo.

Se basa en la reducción del ácido 3,5 dinitrosalicílico (de color amarillo) por los azúcares reductores presentes en el medio formando un compuesto nitroaminado, el cual a medida que se oxida se vuelve de color rojo ladrillo (Figura 22), cuya intensidad es proporcional a la concentración de los azúcares reductores y se mide espectrofotométricamente por lectura de la Absorbancia en la zona de 540-570 nm (Miller, 1959).



**Figura 23** Fundamento método Ácido Dinitrosalicílico (DNS) (Miller G.L. 1959)

El reactivo se preparó adicionando cada uno de los componentes mencionados en la Tabla 9 con las concentraciones marcadas. La adición de los reactivos se realizó con agitación continua y a una temperatura moderada utilizando una plancha con agitador magnético.

Una vez preparado el reactivo se almacenó en un frasco ambar y en refrigeración debido a que es sensible a la degradación por la luz.

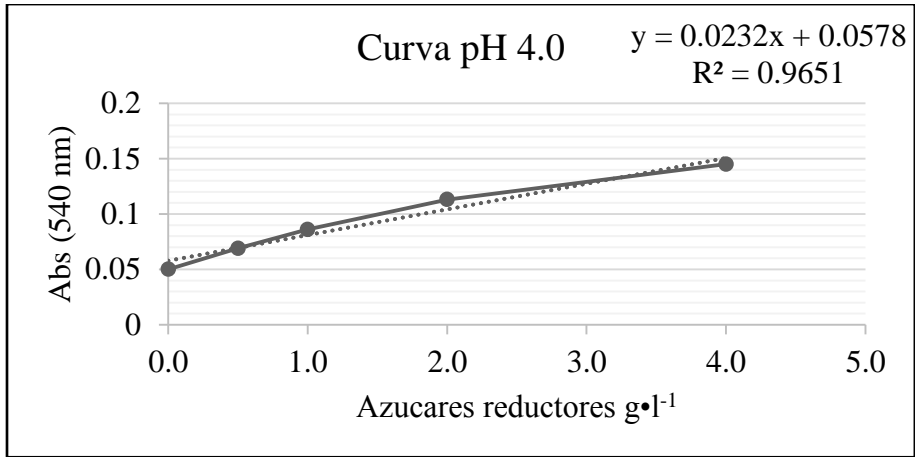
Con los datos de absorbancia obtenidos se realizó la curva de calibración graficando en el eje de las Y la absorbancia obtenida y en el eje de las X los puntos de la concentración de

azúcares medidos (Figura 23-29). Se obtuvo la ecuación lineal de la gráfica con la cual se pudieron cuantificar los azúcares presentes en las muestras de los experimentos realizados.

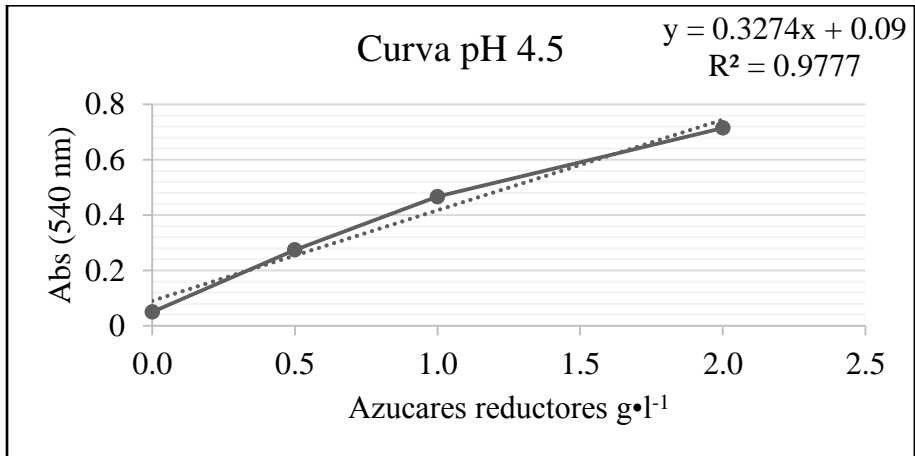
**Tabla 10** Composición de reactivo DNS

<b>COMPUESTO</b>	<b>CONCENTRACION</b>
	<b>g•L<sup>-1</sup></b>
<b>Hidroxido de sodio</b>	10
<b>Ácido 3,5 dinitrosalicílico</b>	10
<b>Tartrato de sodio y potasio</b>	200
<b>Metasulfito de sodio</b>	0.5
<b>Fenol</b>	2.0

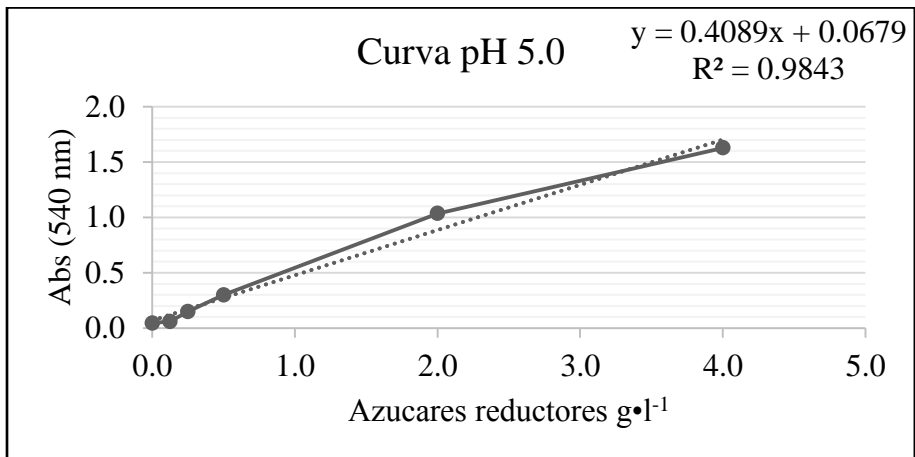
La actividad enzimática se determinó de la siguiente manera: 50 de solución de enzima se añadió a 50 µl de diferentes sustratos (sacarosa, inulina, levano o ATF al 1% p / v en 100 mM de tampón ideal para el pH requerido, se incubó durante 15 min a temperatura requerida, la reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl de ácido dinitrosalicílico (DNS) y se llevó a ebullición durante 5 min a 100 ° C, a continuación, la mezcla se colocó en hielo. El blanco se obtuvo de la siguiente manera 50 µl de sustrato (1% p / v) se incubaron por 15 minutos a la temperatura requerida, a continuación se añadieron 100 µl de ácido dinitrosalicílico (DNS) y después 50 µl de enzima. La absorbancia se midió con un lector de microplacas a 540 nm (Arrizon, et al., 2012). Una unidad de actividad fructanase se definió como la cantidad de enzima que libera un solo mol de azúcares reductores por minuto.



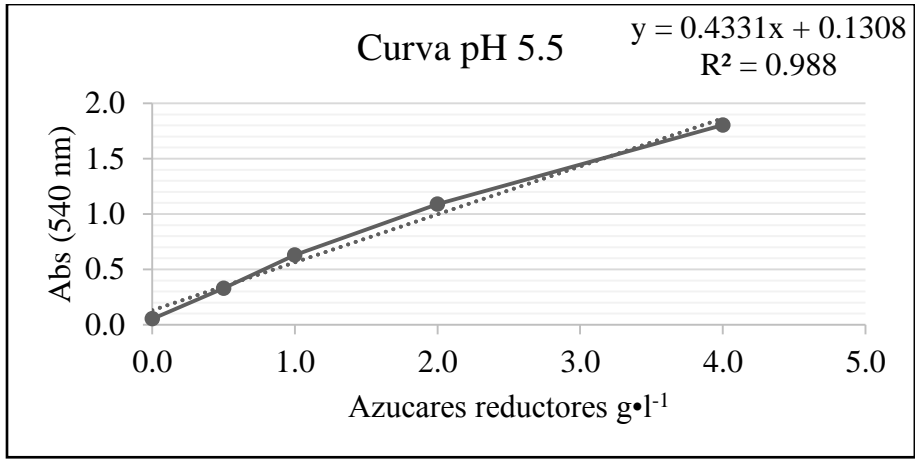
**Figura 24** Curva estándar de DNS pH 4.0



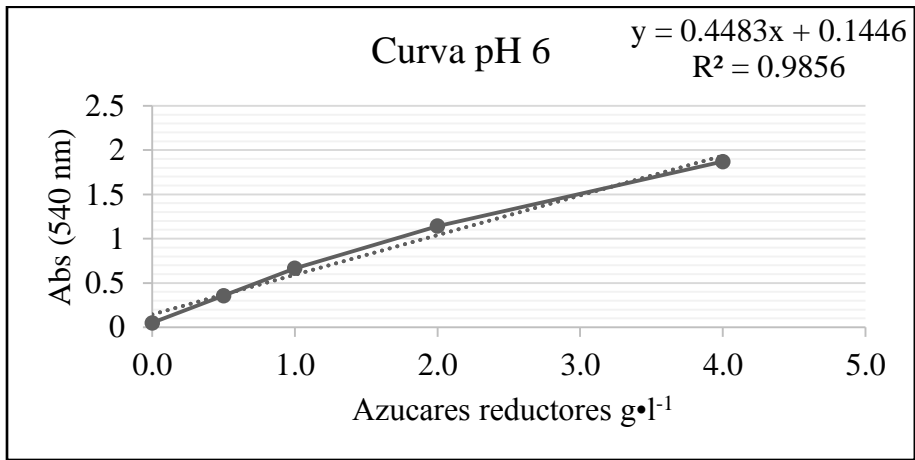
**Figura 25** Curva estándar de DNS pH 4.5



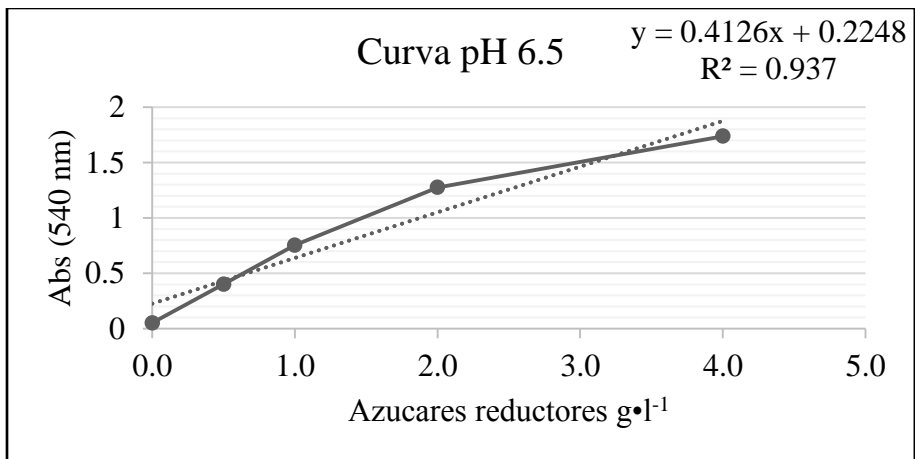
**Figura 26** Curva estándar de DNS pH 5.0



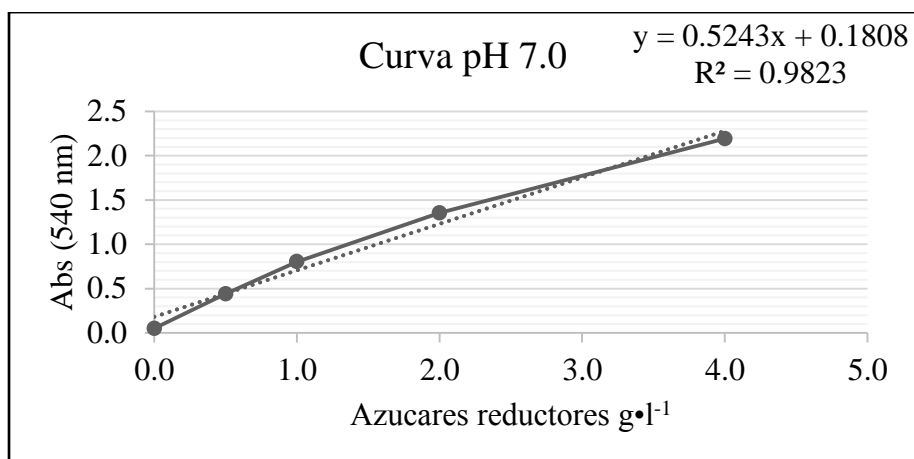
*Figura 27* Curva estándar de DNS pH 5.5



*Figura 28* Curva estándar de DNS pH 6.0



*Figura 29* Curva estándar de DNS pH 6.5



**Figura 30** Curva estándar de DNS pH 7.0

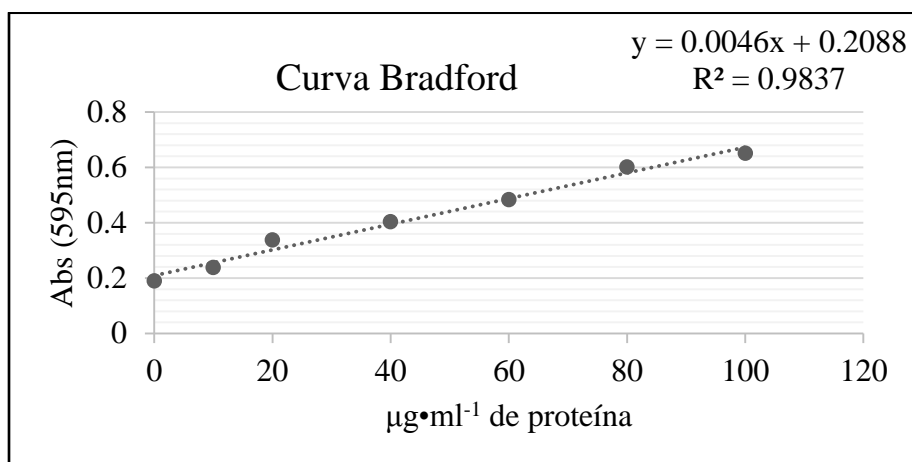
### 9.3 ANEXO C. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR EL METODO DE BRADFORD

La cuantificación de proteínas se realizó utilizando el método propuesto por Bradford y col. (1976). El fundamento de este método consiste en la absorción del colorante azul de Coomassie G250 que se une a las proteínas. En medio ácido, este colorante se adsorbe sobre las proteínas y la formación de este complejo origina un cambio de color, de rojo, para el colorante libre, a azul, para el colorante acoplado a la proteína. Es un método muy sensible (2-5 µg de proteínas) y rápido (aproximadamente 2 min). El complejo proteína-colorante permanece disperso en la solución por un tiempo relativamente largo (aproximadamente 2 h). Los detergentes como el Tritón y el dodecil-sulfato de sodio (SDS), y las bases muy fuertes causan interferencia con este método (Bradford, 1976).

Las muestras se trabajaron por triplicado, añadiéndose 100 µL a la dilución adecuada y 100 µL de la solución de Bradford. Se agitaron las muestras cuidando no generar burbujas, después de transcurridos 5 min, se leyó la absorbancia a 595 nm.

La Albúmina Bovina (BSA) de SIGMA se empleó como proteína estándar para una curva de 0 a 100 µg/ml. De cada dilución preparada, 100 µL fueron agregados en la microplaca y

a cada uno de ellos se les agregó 100  $\mu\text{L}$  de la solución de Bradford. Se agitaron las muestras cuidando no generar burbujas, después de transcurridos 5 min, se leyó la absorbancia a 595 nm obteniéndose una curva estándar que relacionó la absorbancia con la concentración de proteína (figura 30).




**Figura 31** Curva estándar de BSA ( $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), cuantificado por el método de Bradford (1976).

## 9.4 ANEXO D. RESULTADOS ACADEMICOS

Presentación como poster en el congreso biocat2014 que se celebró en Hamburg, Alemania del 31 de Agosto al 4 de Septiembre.

“Purification and biochemical characterization of a fructanase isolated from *Torulaspora delbrueckii*”



**Purification and biochemical characterization of a fructanase isolated from *Torulaspora delbrueckii***

Raymundo Trullas-García, Enrique Ordaz, Jorge-Alberto Rodríguez, Lorena Amaya-Delgado, Javier Arizón  
CIATEJ, Biotecnología Industrial, Normalistas 800, 44270 Guadalajara, México

---

### Introduction


The yeast *Torulaspora delbrueckii* is widely distributed in foods and fermented products such as vegetable oil, wine, cheese, coffee fermentation, meat fermentation and meval fermentation [1,2]. *T. delbrueckii* yeasts have interesting biotechnological properties, such as freeze tolerance and a high osmophilicity, which is useful for sourdough fermentation [3,4]. Recently, different *T. delbrueckii* yeasts isolated from the fermentation process of meval, resulted in good candidates for fructanase and fructosyltransferase activity, being these kind of enzymes better induced with Agave tequilana fructans (ATF) than inulin and showed a high fructanase activity on sucrose. At the moment there is not information about fructanases produced by other Non-Saccharomyces yeasts isolated from the fermentation process of meval. Thus, the purpose of this work was to produce and purify a fructanase from *T. delbrueckii* in order to know its catalytic properties, then to compare it with other commercial enzymes in order to discover new applications. This work is the first report of purification and biochemical characterization of a *T. delbrueckii* fructanase.

### Results


The partially purified enzyme obtained by an anionic exchange column showed a diffuse band of 200 kDa approximately by SDS-PAGE analysis (Figure 1A-I); the same band was observed after complete purification by a gel filtration column, which is typical of holo-glycosylated enzymes. After deglycosylation treatment of purified enzyme with PNGase, a band about 70 kDa was observed which shows its high percent of glycosylation (Figure 1A-II). The fructanase of *T. delbrueckii* tested on different substrates had a optimum pH while varying from 4.5 to 5.5 and the optimum temperature was 40 °C on sucrose, and 45 °C on inulin and ATF (Table 1). The biochemical characterization of the fructanase revealed a dimeric form with high affinity on sucrose (Table 2).

---


### Materials and methods




*T. delbrueckii*




Biochemical characterization



Purification (FFLC)



Tests affinity with different columns



Production of fructanase activity

### Results

In order to produce fructanase activity with a *T. delbrueckii* yeast strain isolated from the fermentation process of meval, different induction experiments were carried out. The intracellular enzyme was induced with Agave tequilana fructans (ATF) while sucrose did not induced fructanase production. The protein was purified by two chromatographic steps with a final purification factor of 328 and a yield recovery of 8.5. The purified enzyme presented a specific activity of 3880.5 U/mg on sucrose (Table 1).

The purified fructanase had an estimated molecular mass of 415 kDa determined by size exclusion chromatography (Figure 1B), however several reports of this kind of enzymes has been reported has dimeric, tetrameric oligomer. Thus, the native protein was treated with  $\beta$ -mercaptoethanol for the separation of monomers, then a Coomassie-stained SDS-PAGE analysis was carried out in samples of partial and complete purification (Figure 1A).

**Table 1: Purification of *T. delbrueckii* fructanase**

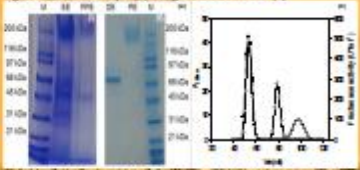
Step	Yield (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification factor
1	464.20	101.6	1.0
2	407.02	20.8	4.5
3	348.2	2.6	39.4
4	236	0.6	168.0

1: Crude extract; 2: Coomassie stained; 3: D: Native whole cells; 4: Native 100 µg yeast

---

### Materials and methods

**Figure 1: SDS-PAGE analysis (A) and gel filtration column (B).**



**Table 1: Kinetic parameters on different substrates.**

Substrate	Molecular weight (kDa)	K <sub>m</sub> (mM)	k <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )	pH <sup>opt</sup>
Inulin	5 (96.6)†	4.5 (0.15)†	45 (0.14)†	10 (6.2)†	4.5
Sucrose	5 (5.420)†	4.0 (0.012)†	30 (0.6)†	10 (6.6)†	4.0

† Maximum fructanase activity (U/mg); †† Percentage of total specific activity (Total activity of 100 U/mg)

### Results

The partially purified enzyme obtained by an anionic exchange column showed a diffuse band of 200 kDa approximately by SDS-PAGE analysis (Figure 1A-I); the same band was observed after complete purification by a gel filtration column, which is typical of holo-glycosylated enzymes. After deglycosylation treatment of purified enzyme with PNGase, a band about 70 kDa was observed which shows its high percent of glycosylation (Figure 1A-II). The fructanase of *T. delbrueckii* tested on different substrates had a optimum pH while varying from 4.5 to 5.5 and the optimum temperature was 40 °C on sucrose, and 45 °C on inulin and ATF (Table 1). The biochemical characterization of the fructanase revealed a dimeric form with high affinity on sucrose (Table 2).

**Table 2: Optimal temperature (°C), optimal pH and thermal stability (°C).**

Substrate	Optimal pH	Optimal T (°C)	Thermal stability (°C)
Inulin	5 (96.6)†	45 (0.14)†	10 (6.2)†
Sucrose	5 (5.420)†	40 (0.012)†	10 (6.6)†

† Maximum fructanase activity (U/mg); †† Percentage of total specific activity (Total activity of 100 U/mg)

**Table 3: Kinetic parameters on different substrates.**

Substrate	Molecular weight (kDa)	K <sub>m</sub> (mM)	k <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )	pH <sup>opt</sup>
Inulin	5 (96.6)†	4.5 (0.15)†	45 (0.14)†	10 (6.2)†	4.5
Sucrose	5 (5.420)†	4.0 (0.012)†	30 (0.6)†	10 (6.6)†	4.0

† Maximum fructanase activity (U/mg); †† Percentage of total specific activity (Total activity of 100 U/mg)

---

### Conclusions

The purified enzyme that was produced by *T. delbrueckii* share some catalytic properties of end-fructanase from *K. maritima* as well as biochemical characteristics of *S. cerevisiae* invertases, which could be caused by the phylogenetic proximity between yeast cells.


### References

- Arino, J.; Morel, S.; Delwaille, A.; Miesse, B. 2012. Fructanase and fructosyltransferase activity of non-Saccharomyces yeasts isolated from brewing trials of Meval. *Brewing Science*, 33(4): 302-305.
- Andrés Salgado, L., Rodríguez-Gómez, E., Barrio, R., Otero, A., García-Fernández, A., Anapolides, P.B., 2013. Expanding the yeast biodiversity of green table olive brined oil fermentations for microbiological applications. *Int. J. Food Microbiol.* 145: 89-96.
- de Vries, L., de Groot, S., Harby, N., Huis, G., Debel, H.M., Wainio, S., 2010. Molecular ecology of meval-like fermentations: Overview and role. *Food Biotechnology* 27, 23-38.
- de Vries, L., de Groot, S., Harby, N., Huis, G., Debel, H.M., Wainio, S., 2013. Characterization of a *Torulaspora delbrueckii* strain with fructanase activity and its application in bread and wheat. *Food Biotechnology* 28, 120-132.



Colaboración en poster en el congreso biocat2014 que se celebró en Hamburg, Alemania del 31 de Agosto al 4 de Septiembre.

“Fructooligosaccharides synthesis by a purified fructanase from *Torulaspora delbrueckii*”



## Fructooligosaccharides synthesis by a purified fructanase from *Torulaspora delbrueckii*.

Enrique Ordaz<sup>1</sup>, Raymundo Trujillo-Carcía<sup>1</sup>, Jorge Rodríguez<sup>1</sup>, Lorena Amaya-Delgado<sup>1</sup>, Javier Arrión<sup>1\*</sup>  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Guadalajara, México.

**Abstract:**  
 Different experimental designs were carried out varying the substrate / enzyme ratio (grams of sucrose/ enzymatic activity, S/E ratio), temperature, Ca<sup>2+</sup> addition and pH. The S/E ratio was the main factor affecting fructooligosaccharides (FOS) production. The highest FOS synthesis yield was reached at 40 °C, pH 6.5 and S/E ratio of 1. The addition of calcium (Ca<sup>2+</sup>) did not affect the transfructosylating activity. This is the first report of FOS synthesis with a transfructosylating *T. delbrueckii* enzyme.

**Introduction**

Due to the high interest in the food industry for fructooligosaccharides (FOS), the search for new enzymes with catalytic ability in FOS synthesis (fructosyltransferases) and the optimization of its application in enzymatic processes constitutes a technological advantage. It has been found that *Non-Saccharomyces* yeast from Agave fermenting processes produce new fructanases with transfructosylating activity (Arrión et al. 2012). Recently a new fructanase secreted by *Torulaspora delbrueckii* was purified (416 kDa) and tested for fructooligosaccharides (FOS) synthesis. This is the first report of FOS synthesis with a fructanase from *T. delbrueckii*.

The main purpose of this work was to investigate the transfructosylating reactions with sucrose carried out by this enzyme in the synthesis of FOS.

**Methodology**

Table 1. Experimental designs

Experimental Design	Factors	Level		Conditions
		Low	High	
A	S/E Ratio	1:2	2:2	700 g/L sucrose
	Temperature (°C)	40	50	
	pH	4.0	6.0	
B	S/E Ratio	1:3	3:3	700 g/L sucrose
	pH	5.5	6.5	
	Ca <sup>2+</sup> (mM)	0.02	0.03	
C	Extra enzyme addition after 24h of reaction	No	Yes	700 g/L sucrose 40 °C

**Results**

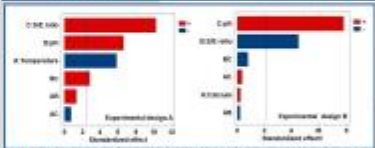


Figure 2. Standard Pareto chart for FOS production in experimental design A and B.

Statistical analysis of the first experiment showed that the S/E ratio and pH were the main factors affecting the yield of FOS, because of that, these two factors were varied along with the addition of calcium at various concentrations in the next experiments. However, calcium did not affect the synthesis of FOS significantly.

Table 2. Best reaction condition for all experiments

Experimental Design	FOS (g/L)	Best reaction conditions	
		S/E ratio	pH
A	26.9 ± 4.6	2:2	6.0
B	42.9 ± 1.2	1:3	6.5
C	46.2 ± 1.8	1	6.5

Maximum FOS production in experimental design A was 26.9 g/L. In this preliminary design, variations in the levels of each factor were based on those reported for other similar enzymes. Maximum production of FOS for the next experimental design (B) was 42.9 g/L significantly improving the production of FOS. In the last experiment (C) the effect of extra addition of enzyme after 24 hours of reaction was tested, showing that the addition of more enzyme during the reaction did not increase significantly the production.

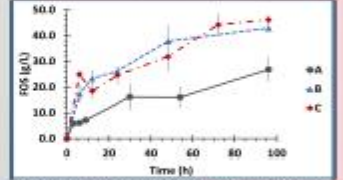


Figure 3. FOS production over time for best reaction conditions.

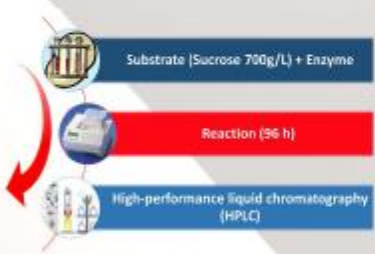


Figure 1. Overall methodology

CONACYT PROJECT 181766

**References:**  
 Arrión, J., Ordaz, E., Rodríguez, J., Arrión, J. (2012). Fructanase and fructosyltransferase activity of non-Saccharomyces yeasts isolated from fermenting musts of Henequen. *Bioresource Technology* 116, 480-486.

**Participación en el congreso BIOTECNOLOGÍA HABANA 2014 que se celebró en La Habana el 1 de diciembre 2014.**

“Comparison of the  $\beta$ -fructofuranosidase induction from *Candida apicola* in submerged and solid state fermentation”



Participación en XXXVI Encuentro Nacional de la AMIDIQ, Llevado a cabo del 5 al 8 de mayo de 2015 en Cancún, Quintana Roo, México



**La Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química, A.C.**

Otorga la presente

**CONSTANCIA**

a

**TRUJILLO GARCÍA RAYMUNDO**

por su asistencia al:

**XXXVI Encuentro Nacional de la AMIDIQ**  
"Retos de la Ingeniería Química en la Globalización"

Llevado a cabo del 5 al 8 de mayo de 2015 en Cancún, Quintana Roo, México

Dr. Juan Gabriel Segovia Hernández  
PRESIDENTE DE AMIDIQ

Dr. Adolfo Rosillo Periciolet  
PRESIDENTE DEL COMITÉ ORGANIZADOR

Dr. Tomás Alvarado García  
PRESIDENTE DEL COMITÉ TÉCNICO



# Memoria en extenso “EFECTO DEL pH Y DE LA RELACIÓN SUSTRATO ENZIMA SOBRE LA SÍNTESIS DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS CON UNA $\beta$ -FRUCTOFURANOSIDASA PURIFICADA DE *Torulasporea delbrueckii*”

XXXVI Encuentro Nacional de la AMIDIQ, Llevado a cabo del 5 al 8 de mayo de 2015 en Cancún, Quintana Roo, México

Memorias del XXXVI Encuentro Nacional de la AMIDIQ  
5 al 8 de Mayo de 2015, Cancún, Quintana Roo, México

## EFECTO DEL PH Y DE LA RELACIÓN SUSTRATO ENZIMA SOBRE LA SÍNTESIS DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS CON UNA $\beta$ -FRUCTOFURANOSIDASA PURIFICADA DE *Torulasporea delbrueckii*

Raymundo Trujillo<sup>1</sup>, Enrique Ordaz<sup>1</sup>, Jorge Rodríguez<sup>1</sup>, Lorena Amaya<sup>1</sup>, Javier Arrizon<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Avenida Normalistas #800, Col. Colinas de la Normal, 44270 Guadalajara, Jalisco, México.

<sup>2</sup>Correo electrónico de autor de contacto: jarrizon@ciatej.mx, jarrizon@hotmail.com

### Resumen

Un diseño experimental superficie de respuesta fue utilizado para observar el efecto que presentan dos factores, el pH y la relación sustrato enzima (S/E) en la síntesis de Fructooligosacáridos de cadena corta (FOS) usando una  $\beta$ -fructofuranosidasa purificada de *Torulasporea delbrueckii*. Esta enzima presenta mayor actividad fructosiltransferasa a una concentración de sacarosa inicial de 700 g/l y temperatura de 45°C. El modelo ( $p < 0.05$ ) se ajustó en un 95.3 %, el cual nos muestra que ambos factores (pH y S/E) presentan efecto significativo en la síntesis de FOS, dando como resultado un pH óptimo de 5.9 y la relación S/E de 0.95 (g sacarosa / UmL<sup>-1</sup>) con una producción de FOS de 30 gL<sup>-1</sup>.

### 1. Introducción

El término Fructooligosacáridos (FOS) es usado hoy en día para oligómeros de fructosa, que contienen una unidad de glucosa y de 2 a 4 unidades de fructosa unidas por un enlace glicosídico  $\beta$ -2,1 [1]. Estos FOS constituyen una importante clase de carbohidratos debido a la  $\beta$ -configuración del C2 anomérico en sus monómeros de fructosa, la inulina y la oligofructosa son resistentes a la hidrólisis por enzimas digestivas humanas, debido a esto, los fructooligosacáridos son clasificados como oligosacáridos no digeribles lo que los hace que actúen como prebióticos [2, 3]. De las principales características prebióticas que presentan es que no son cariogénicos, brindan resistencia a infecciones, son de bajo dulzor y brindan una baja energía calórica, mejoran la absorción de minerales en el tracto gastrointestinal, no son digeribles lo que ayuda a estimular el crecimiento y desarrollo de la microflora gastrointestinal también llamada probiótica [4].

Los FOS de grado alimenticio comercialmente pueden ser obtenidos de diversas fuentes o procesos industriales [5]: En primer caso tenemos que se encuentran naturalmente en distintos alimentos de consumo humano como pueden ser: Fructanos (inulina), Oligosacáridos de la Soya como Rafinosa y estequiosa por extracción directa del concentrado de Soya. De igual manera existe la hidrólisis o síntesis química y enzimática de oligosacáridos.

La hidrólisis y síntesis enzimática de FOS es llevada a cabo por enzimas fructosiltransferasas, también conocidas como  $\beta$ -fructofuranosidasas debido a una actividad secundaria obtenida a altas concentraciones de sacarosa. Estas enzimas han sido reportadas principalmente de hongos del género *Aspergillus* y *Ascoobasidium* [6]. En bacterias incluyen estudios en *Bacillus macerans*, *Zymomonas mobilis*, *Lactobacillus reuteri*, a pesar del conocimiento que se tiene sobre la producción de invertasas, poco se puede encontrar de levaduras productoras de enzima capaces de producir FOS [7, 8]. De las levaduras reportadas para la producción de enzimas capaces de sintetizar FOS son del género *Kluyveromyces*, *Rhodotorula sp.*, *Candida*, *Saccharomyces* [6].

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Action, E. C. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *British Journal of Nutrition*, 81(1).
- Albertin, W., Chasseriaud, L., Comte, G., Panfili, A., Delcamp, A., Salin, F., . . . Bely, M. (2014). Winemaking and Bioprocesses Strongly Shaped the Genetic Diversity of the Ubiquitous Yeast *Torulaspora delbrueckii*. *PLOS ONE*, 9(4), e94246. doi: 10.1371/journal.pone.0094246
- Albertin, W., Miot-Sertier, C., Bely, M., Marullo, P., Coulon, J., Moine, V., . . . Masneuf-Pomarede, I. (2014). Oenological prefermentation practices strongly impact yeast population dynamics and alcoholic fermentation kinetics in Chardonnay grape must. *International Journal of Food Microbiology*, 178, 87-97.
- Almeciga-Diaz, C. J., Gutierrez, A. M., Bahamon, I., Rodriguez, A., Rodriguez, M. A., & Sanchez, O. F. (2011). Computational analysis of the fructosyltransferase enzymes in plants, fungi and bacteria. *Gene*, 484(1-2), 26-34. doi: 10.1016/j.gene.2011.05.024
- Álvaro-Benito, M., de Abreu, M., Fernández-Arrojo, L., Plou, F. J., Jiménez-Barbero, J., Ballesteros, A., . . . Fernández-Lobato, M. (2007). Characterization of a  $\beta$ -fructofuranosidase from *Schwanniomyces occidentalis* with transfructosylating activity yielding the prebiotic 6-kestose. *Journal of Biotechnology*, 132(1), 75-81. doi: 10.1016/j.jbiotec.2007.07.939
- Andjelković, U., Pićurić, S., & Vujčić, Z. (2010). Purification and characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase isoforms. *Food Chemistry*, 120(3), 799-804.
- Arrizon, J., Morel, S., Gschaedler, A., & Monsan, P. (2011). Purification and substrate specificities of a fructanase from *Kluyveromyces marxianus* isolated from the

fermentation process of Mezcal. *Bioresource Technology*, 102(3), 3298-3303. doi: 10.1016/j.biortech.2010.10.071

Arrizon, J., Morel, S., Gschaedler, A., & Monsan, P. (2012). Fructanase and fructosyltransferase activity of non-Saccharomyces yeasts isolated from fermenting musts of Mezcal. *Bioresource Technology*, 110, 560-565.

Arrizón, J., Urias-Silvas, J. E., Sandoval, G., Mancilla-Margalli, N. A., Gschaedler, A. C., Morel, S., & Monsan, P. (2014). Production and Bioactivity of Fructan-Type Oligosaccharides *Food Oligosaccharides* (pp. 184-199): John Wiley & Sons, Ltd.

Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Barrio, E., Querol, A., Garrido-Fernández, A., & Arroyo-López, F. (2011). Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. *International Journal of Food Microbiology*, 147(2), 89-96.

Belcarz, A., Ginalska, G., Lobarzewski, J., & Penel, C. (2002). The novel non-glycosylated invertase from *Candida utilis* (the properties and the conditions of production and purification). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1594(1), 40-53.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1), 248-254.

Brocklebank, K. J., & Hendry, G. A. F. (1989). Characteristics of plant species which store different types of reserve carbohydrates. *New Phytologist*, 112(2), 255-260. doi: 10.1111/j.1469-8137.1989.tb02381.x

Chen, J., Chen, X., Xu, X., Ning, Y., Jin, Z., & Tian, Y. (2011). Biochemical characterization of an intracellular 6G-fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces*

*dendrorhous* and its use in production of neo-fructooligosaccharides (neo-FOSs). *Bioresource Technology*, 102(2), 1715-1721. doi: 10.1016/j.biortech.2010.08.033

Dey, S., & Agarwal, S. O. (1999). Characterization of a thermostable alpha-amylase from a thermophilic *Streptomyces megasporus* strain SD12. *Indian J Biochem Biophys*, 36(3), 150-157.

Evangelista, S. R., Silva, C. F., da Cruz Miguel, M. G. P., de Souza Cordeiro, C., Pinheiro, A. C. M., Duarte, W. F., & Schwan, R. F. (2014). Improvement of coffee beverage quality by using selected yeasts strains during the fermentation in dry process. *Food Research International*, 61, 183-195.

Flamm, G., Glinsmann, W., Kritchevsky, D., Prosky, L., & Roberfroid, M. (2001). Inulin and oligofructose as dietary fiber: a review of the evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 41(5), 353-362.

Ghazi, I., Fernandez-Arrojo, L., Garcia-Arellano, H., Ferrer, M., Ballesteros, A., & Plou, F. J. (2007). Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. *Journal of Biotechnology*, 128(1), 204-211.

Gibson, G. R., Probert, H. M., Van Loo, J., Rastall, R. A., & Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev*, 17(2), 259-275.

Gomez, E., Tuohy, K. M., Gibson, G. R., Klinder, A., & Costabile, A. (2009). In vitro evaluation of the fermentation properties and potential prebiotic activity of Agave fructans. *Journal of Applied Microbiology*. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04617.x

Gong, F., Zhang, T., Chi, Z., Sheng, J., Li, J., & Wang, X. (2008). Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Pichia*

*guilliermondii* and inulin hydrolysis by the purified inulinase. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13(5), 533-539.

Guarner, F., Khan, A. G., Garisch, J., Eliakim, R., Gangl, A., Thomson, A., . . . De Paula, J. (2008). World Gastroenterology Organisation Practice Guideline: Probiotics and Prebiotics-May 2008: guideline. *South African Gastroenterology Review*, 6(2), 14-25.

Gutiérrez-Alonso, P., Fernández-Arrojo, L., Plou, F. J., & Fernández-Lobato, M. (2009). Biochemical characterization of a  $\beta$ -fructofuranosidase from *Rhodotorula dairenensis* with transfructosylating activity. *FEMS Yeast Research*, 9(5), 768-773.

Han, Y., & Watson, M. (1992). Production of microbial levan from sucrose, sugarcane juice and beet molasses. *Journal of industrial microbiology*, 9(3-4), 257-260.

Han, Y. W. (1990). Microbial levan. *Adv. Appl. Microbiol*, 35(171194), 2.

Hernalsteens, S., & Maugeri, F. (2008a). Partial Purification and Characterization of Extracellular Fructofuranosidase with Transfructosylating Activity from *Candida* sp. *Food and Bioprocess Technology*, 3(4), 568-576. doi: 10.1007/s11947-008-0089-3

Hernalsteens, S., & Maugeri, F. (2008b). Properties of thermostable extracellular FOS-producing fructofuranosidase from *Cryptococcus* sp. *European Food Research and Technology*, 228(2), 213-221. doi: 10.1007/s00217-008-0925-8

Hernalsteens, S., & Maugeri, F. (2008c). Purification and characterisation of a fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(4), 589-596. doi: 10.1007/s00253-008-1470-x



- Hernalsteens, S., & Maugeri, F. (2010). Synthesis of Fructooligosaccharides Using Extracellular Enzymes From *Rhodotorula* sp. *Journal of Food Biochemistry*. doi: 10.1111/j.1745-4514.2009.00295.x
- Hernandez-Lopez, M. J., Prieto, J. A., & Rande-Gil, F. (2003). Osmotolerance and leavening ability in sweet and frozen sweet dough. Comparative analysis between *Torulasporea delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast strains. *Antonie van Leeuwenhoek*, 84(2), 125-134. doi: 10.1023/a:1025413520192
- Hidaka, H., Eida, T., Takizawa, T., Tokunaga, T., & Tashiro, Y. (1986). Effects of Fructooligosaccharides on Intestinal Flora and Human Health. *Bifidobacteria and Microflora*, 5(1), 37-50. doi: 10.12938/bifidus1982.5.1\_37
- Johnson, R. J., Rivard, C., Lanaspá, M. A., Otabachian-Smith, S., Ishimoto, T., Cicerchi, C., . . . Hess, T. (2013). Fructokinase, Fructans, Intestinal Permeability, and Metabolic Syndrome: An Equine Connection? *Journal of Equine Veterinary Science*, 33(2), 120-126. doi: 10.1016/j.jevs.2012.05.004
- Kurtzman, C., Fell, J. W., & Boekhout, T. (2011). *The yeasts: a taxonomic study* (Vol. 1): Elsevier.
- Lafraya Aguado, Á. (2011). Análisis molecular, modificación funcional y producción de enzimas susceptibles de ser utilizadas en la síntesis de fructooligosacáridos.
- Lammens, W., Le Roy, K., Schroeven, L., Van Laere, A., Rabijns, A., & Van den Ende, W. (2009). Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications. *Journal of Experimental Botany*, 60(3), 727-740. doi: 10.1093/jxb/ern333
- Lammens, W., Le Roy, K., Van Laere, A., Rabijns, A., & Van den Ende, W. (2008). Crystal Structures of *Arabidopsis thaliana* Cell-Wall Invertase Mutants in

Complex with Sucrose. *Journal of Molecular Biology*, 377(2), 378-385. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2007.12.074>

Linde, D., Rodríguez-Colinas, B., Estévez, M., Poveda, A., Plou, F. J., & Lobato, M. F. (2012). Analysis of neofructooligosaccharides production mediated by the extracellular  $\beta$ -fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Bioresource Technology*, 109, 123-130.

Madrigal, L., & Sangronis, E. (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 57(4), 387-396.

Maiorano, A., Piccoli, R., da Silva, E., & de Andrade Rodrigues, M. (2008). Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of pre-biotics. *Biotechnology Letters*, 30(11), 1867-1877. doi: 10.1007/s10529-008-9793-3

Maley, F. (1996). Studies on Identifying the Catalytic Role of Glu-204 in the Active Site of Yeast Invertase. *Journal of Biological Chemistry*, 271(24), 13953-13958. doi: 10.1074/jbc.271.24.13953

Maugeri, F., & Hernalsteens, S. (2007). Screening of yeast strains for transfructosylating activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 49(1-4), 43-49. doi: 10.1016/j.molcatb.2007.08.001

Mendoza, L. M., Padilla, B., Belloch, C., & Vignolo, G. (2014). Diversity and enzymatic profile of yeasts isolated from traditional llama meat sausages from north-western Andean region of Argentina. *Food Research International*, 62, 572-579.

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.

- Montel, M.-C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D. A., Desmasures, N., & Berthier, F. (2014). Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology*, *177*, 136-154.
- Moore, N., Chao, C., Yang, L.-P., Storm, H., Oliva-Hemker, M., & Saavedra, J. M. (2003). Effects of fructo-oligosaccharide-supplemented infant cereal: a double-blind, randomized trial. *British Journal of Nutrition*, *90*(03), 581-587.
- Nakakuki, T. (2005). Present Status and Future Prospects of Functional Oligosaccharide Development in Japan. *Journal of Applied Glycoscience*, *52*(3), 267-271. doi: 10.5458/jag.52.267
- 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. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.10.022>
- Ohta, K., Suetsugu, N., & Nakamura, T. (2002). Purification and properties of an extracellular inulinase from *Rhizopus* sp. strain TN-96. *J Biosci Bioeng*, *94*(1), 78-80.
- Olagnero, G., Abad, A., Bendersky, S., Genevois, C., Granzella, L., & Montonati, M. (2007). Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos.
- Reddy, A., & Maley, F. (1996). Studies on identifying the catalytic role of Glu-204 in the active site of yeast invertase. *J Biol Chem*, *271*(24), 13953-13957.
- Roberfroid, M. B. (2000). Chicory fructooligosaccharides and the gastrointestinal tract. *Nutrition*, *16*(7), 677-679.

- Rodríguez, M. A., Sánchez, O. F., & Alméciga-Díaz, C. J. (2010). Gene cloning and enzyme structure modeling of the *Aspergillus oryzae* N74 fructosyltransferase. *Molecular Biology Reports*, 38(2), 1151-1161. doi: 10.1007/s11033-010-0213-0
- Santos, A. M. P. (2003). *Síntese de oligossacarídeos a partir da sacarose por inulinase de Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus*. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Faculdade de Engenharia de Alimentos.
- Serrano Galvis, L. (2006). Determinación de las poblaciones microbiológicas en el proceso de extracción de jugo de caña de azúcar en el ingenio Manuelita SA.
- Sheng, J., Chi, Z., Gong, F., & Li, J. (2008). Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the purified inulinase. *Applied biochemistry and biotechnology*, 144(2), 111-121.
- Silva, M. F., Rigo, D., Mossi, V., Golunski, S., de Oliveira Kuhn, G., Di Luccio, M., . . . 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. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.09.118
- Singh, R. S., Dhaliwal, R., & Puri, M. (2007). Partial purification and characterization of exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 for preparation of high-fructose syrup. *Journal of microbiology and biotechnology*, 17(5), 733-738.
- Stephen, A. M., & Phillips, G. O. (2006). *Food polysaccharides and their applications* (Vol. 160): CRC Press.
- Steve Withers, S. W. (Producer). (2015). Glycoside hydrolases. *CAZypedia*. Retrieved from <http://www.cazypedia.org/>

- Swennen, K., Courtin, C. M., & Delcour, J. A. (2006). Non-digestible oligosaccharides with prebiotic properties. *Critical reviews in food science and nutrition*, 46(6), 459-471.
- Tian, F., Karboune, S., & Hill, A. (2014). Synthesis of fructooligosaccharides and oligolevans by the combined use of levansucrase and endo-inulinase in one-step bi-enzymatic system. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 22, 230-238. doi: 10.1016/j.ifset.2013.12.004
- Tofalo, R., Chaves-López, C., Di Fabio, F., Schirone, M., Felis, G. E., Torriani, S., . . . Suzzi, G. (2009). Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must. *International Journal of Food Microbiology*, 130(3), 179-187.
- Trujillo, R., Ordaz, E., Rodriguez, J., Amaya-Delgado, L., & Arrizon, J. (2014). Purification and biochemical characterization of a fructanase isolated from *Torulasporea delbrueckii*. *7th International congress on biocatalysis, P1-0*, 30.
- van Arkel, J., Vergauwen, R., Sévenier, R., Hakkert, J. C., van Laere, A., Bouwmeester, H. J., van der Meer, I. M. (2012). Sink filling, inulin metabolizing enzymes and carbohydrate status in field grown chicory (*Cichorium intybus* L.). *Journal of plant physiology*, 169(15), 1520-1529.
- Yun, J. W. (1996). Fructooligosaccharides—occurrence, preparation, and application. *Enzyme and Microbial Technology*, 19(2), 107-117.