



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CELULAR Y BIOCATÁLISIS

“Estudio de la formación de nanopartículas de inulina y sus propiedades biológicas”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Ing. Maira Citlalli Jiménez Sánchez

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. CLARITA OLVERA CARRANZA IBT, UNAM

INTEGRANTES DE COMITÉ TUTOR:

DRA. MARCELA AYALA (IBT, UNAM)

DR. VICTOR BERMÚDEZ (INSP)

CUERNAVACA, MORELOS.

JUNIO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Investigación en Programas Institucionales (LIPI), Departamento de Ingeniería celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Clarita Olvera Carranza. El proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante el sistema de becas de posgrado con número de becario No. 663659 y por el apoyo económico otorgado por la UNAM a través del proyecto CB-SEP No. 219728, BMBF-CONACYT-No. 267620 y DGAPA-PAPIIT UNAM IN213616.

Dedicatoria

Mamá: Siempre te has tomado muy en serio tu papel de guía y ejemplo en la ciencia y en la vida, sino estuvieses a mi lado seguramente me hubiese faltado cierta dosis de voluntad para terminar de dar este gran paso que este proyecto encierra. Sino fuese por tu apoyo incondicional no viviría con esta enorme sonrisa, ni despertaría cada mañana con las manos contenidas siempre deseando más. ¿No te cansas de amarme tanto? ¿en qué momento te das un respiro? Porque nunca te has agotado de hacer mi vida extraordinaria. Qué más puedo decir, gracias a ti veo la vida con los ojos llenos de fe y esperanza. Te amo (se escribe cortito, pero se siente inmenso). Gracias por ser mi madre.

Papá: Desde niña has sostenido mis sueños y los has alimentado con mucha paciencia, me has enseñado a ver la grieta entre el objetivo y la realidad, a apretar la mandíbula y respirar profundo cuando me equivoco. Sé que mi alegría es tu alegría, que mi dolor te duele más a ti, y que te he decepcionado en algunas ocasiones, pero por encima de todo, tengo la certeza de que siempre estás y estarás ahí. Gracias por siempre cobijarme e impulsarme. A pesar de que surjan nuevas distancias, en mi corazón llevaré tu marca. Te amo Papá.

Liliana: ¡Me haces sentir tan orgullosa! Cuando naciste no me quedó más remedio que amarte, y no te imaginas lo mucho que me has regalado con ese milagro. No es fácil tener el rol de hermana mayor, sé que he tenido algunas fallas, sin embargo tú jamás has dejado de creer en mí. En esta culminación, tu presencia es un claro ejemplo de tu apoyo incondicional. Cuando mi navío ha perdido su rumbo, tu confianza en mí, es la cuerda que me regresa a puerto seguro. No quiero que pase un solo día, sin que sepas que siempre estaré para ti.

Pamela: Eres un ser ubicuo. En estos últimos ocho años, no importa donde estés o donde me encuentre yo, siempre me acompañas a través de tus palabras. Gracias amiga porque en muchas ocasiones alumbraste mi sendero para no perder el camino hacia mis sueños. Gracias por tantas experiencias compartidas, tanto académicas como de vida (claramente de las mejores). Próximamente empezará una nueva etapa, me llena de felicidad que seas mi compañera a bordo, será increíble compartir una experiencia más contigo. Te quiero.

Paulina y Octavio: Quiero felicitarlos por la excelente decisión que tuvieron de adoptarme muchas veces como su tercera rueda. Haré todo lo posible para que no se arrepientan. Me encanta ser parte de su historia y ustedes de la mía. No quería dejar pasar la oportunidad de agradecerles por participar en otro capítulo de mi vida que hoy culmina. Gracias por todo lo compartido y lo que falta. Gracias por ser estrellas y no cometas. Los quiero. Esto también va para ustedes.

Ángela: Cuando crees que el destino ya no te puede sorprender más, apareces tú. ¿Cómo pueden dos personas tan paralelas coincidir? Esta maestría me trajo tantas satisfacciones y una de ellas fue conocerte. Gracias por siempre motivarme a crear y crear. Gracias por escucharme, por estar al pendiente de mí sin importar la distancia y los diferentes acontecimientos. Eres un ser increíble.

Héctor: Alguien me dijo que cuando la noche cubre el cielo, y las estrellas lo adornan, unos seres viajan desde otro universo para hacer sonreír a quienes no han tenido un buen día. Tú tienes ese don. Gracias por tus palabras, tu tiempo y consejos, tanto académicos como de vida. Por caminar sin preguntar el destino y simplemente confiar. Dejaste una huella en mí que perdurará por siempre. Gracias por todo.

Rogelio: Gracias por una increíble amistad, por siempre escucharme, por aquellos tantos kilómetros caminados. Gracias por apoyarme incondicionalmente y siempre estar para mí. Sobretudo en aquellas clases de EVAP que me llevaron a donde hoy estoy. Tienes todo mi cariño y amistad.

Jaime: Me imagino que a diario recibes agradecimientos de muchas personas que te rodean, de tus alumnas y alumnos, y de todos aquellos y todas aquellas que de algún modo les has ayudado a transformar su vida. Pues bien, he aquí un agradecimiento más. Eres un gran ejemplo para mí. Gracias por regalarme de tu tiempo y de tus consejos. A lo largo de esta maestría hay vetas de ti que me han ayudado a restaurar la travesía. Esto también es para ti.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Francisco, Arisbeth, Flor, Carlos, Salvador y Cristina. Por su apoyo y por compartir lo mejor de cada uno. Doña Au por siempre recibirme con una gran sonrisa y darme un aliciente más para seguir. Gracias a mis amigos de vida Claudia, Karen, Josué y Jorge que a pesar del tiempo sé que están aquí.

A cada uno de mis maestros a lo largo de mi formación, a cada hora invertida, cada artículo encontrado, cada libro, sueño y ciudad que me enseñó que la vida es corta y que el aprendizaje vale más que cualquier cosa tangible. Tomé la mejor decisión que fue seguir los pasos de mis padres, a amar lo que hago y seguir sonriendo a pesar de cada una de las caídas que he tenido. Que siempre habrá alguien o algo nuevo que descubrir.

Agradecimientos

A la Dra. Clarita Olvera por permitirme ser parte de este grupo de trabajo, por la confianza brindada y ser partícipe en mi crecimiento profesional y personal. Gracias por todo.

A la Dra. Marcela Ayala y al Dr. Víctor Bermúdez por su tutoría y apoyo para llevar a cabo este proyecto. Gracias por cada consejo y ser una excelente guía.

Al comité revisor de tesis por sus acertados comentarios: Dra. Laura Palomares Aguilera, Dr. Carlos Peña Malacara, Dr. Rafael Vázquez Duhalt, Dra. Liliana Alamilla Beltrán y Dr. Adrián Ochoa Leyva.

Dr. Agustín López Munguía gracias por el tiempo y conocimiento brindado durante mi estancia, por su apoyo incondicional.

A la Dra. Guadalupe Zavala por el valioso apoyo técnico en la visualización y análisis de las nanopartículas de inulina por microscopía electrónica de transmisión.

Al Biólogo Mario Caro por el apoyo técnico brindado en la liofilización de fructanas empleadas en este trabajo.

Al Dr. Ricardo Martín Castro Acosta por su apoyo en las determinaciones de tamaño de partícula utilizando el equipo Zetasizer el cual fue esencial en la realización de este proyecto.

Al laboratorio de la Dra. Laura Palomares por el préstamo del equipo Zetasizer.

A la Dra. Monika Müller, Dr. Praznik Werner y Dra. Renate Loeppert por la oportunidad de realizar mi estancia de investigación en el Departamento de Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Viena, así como los conocimientos brindados.

A la técnico laboratorista Aurelia Ocampo por su apoyo en la preparación de soluciones y medios de cultivo así como por su valiosa labor en el día a día del laboratorio

A la bióloga Rosa Román Miranda, por el apoyo técnico otorgado en la purificación enzimática y preparación de soluciones.

A Fernando González por el apoyo técnico en los equipos de cromatografía necesarios para la realización del presente trabajo.

Al estudiante de doctorado Jaime Porras por su constante asesoría y gran apoyo académico.

Al estudiante de doctorado Enrique Raga por la donación de fructanas y fructooligosacáridos utilizados en este proyecto y en la estancia realizada en la Universidad de Viena.

A la estudiante de doctorado Esmeralda Cuevas Juárez por su apoyo en los ensayos realizados sobre potencial prebiótico.

A la M. en C. Ma. Elena Rodríguez por el apoyo otorgado, tanto académico como personal.

Al Instituto de Biotecnología, por el apoyo económico para realizar mi estancia de investigación en la Universidad de Viena, Austria.

Índice

Resumen	1
1. Introducción.....	3
2. Antecedentes.....	5
2.1. Fructanas.....	5
2.2. Propiedades físicas y químicas de la inulina	6
2.3. Aplicaciones de las fructanas.....	9
2.4. Nanopartículas de fructanas.....	12
3. Justificación.....	15
4. Hipótesis	15
5. Objetivo General.....	15
6. Objetivos Específicos.....	15
7. Estrategia experimental	16
8. Materiales y Métodos	17
8.1. Expresión de proteína recombinante IslA4.....	17
8.2. Métodos generales de purificación y análisis de proteínas	18
8.3. Métodos generales de identificación y análisis de productos.....	20
8.4. Determinación del porcentaje de ramificación de polímero.....	21
8.5. Reacción enzimática para la producción de inulina.....	22
8.6. Métodos de análisis de nanopartículas	23
8.7. Pruebas de citotoxicidad	25
8.8. Determinación de potencial prebiótico	25
9. Resultados y Discusión	28
9.1. Propiedades fisicoquímica de las nanopartículas de inulina.	28
9.1.1.Determinación del grado de ramificación de la inulina	28
9.1.2.Determinación del número de nanopartículas.....	30
9.1.3.Potencial Z.....	31
9.2. Estudio de la formación de nanopartículas de inulina durante la reacción de síntesis del polímero.	32
9.2.1.Caracterización morfológica de las nanopartículas de inulina sintetizadas enzimáticamente.	36
9.2.2.Efecto de las condiciones de reacción sobre la formación y tamaño de las nanopartículas de inulina.....	37
9.2.3.Análisis de la reacción de síntesis de polímero de inulina a 4°C y la formación de nanopartículas.	41
9.2.4.Morfología de Nanopartículas autoensambladas a 4°C	45
9.3. Evaluación de las propiedades biológicas de las nanopartículas de inulina.	47
9.3.1.Citotoxicidad	47
9.3.2.Potencial prebiótico	48
10. Conclusiones.....	55
11. Perspectivas.....	57

Índice de figuras

Figura 1. Representación estructural de las fructanas	5
Figura 2 Reacciones catalizadas por las fructosiltransferasas	6
Figura 3. Micrografía utilizando microscopia electrónica de barrido (SEM) de partículas de inulina.	7
Figura 4. Representación esquemática de la formación de nanopartículas a) cadenas de inulina b) formación de enlaces de hidrógeno entre glucosa-fructosa c) hebras formadas de inulina d) hebras formando estructuras tipo esferulitas.....	8
Figura 5. Vías de administración de los derivados de fármacos con inulina.....	11
Figura 6. Micrografía de a) Levana C. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> b) Inulina citreum. <i>Leuconostoc citreum</i>	14
Figura 7. Gel SDS-PAGE del ensayo de purificación de la enzima Isla4.....	19
Figura 8. Cromatograma obtenido por GLC/FID de la inulina metilada y acetilada de <i>Leuconostoc citreum</i>	22
Figura 9. Estructura de inulina sintetizada por inulosacarasa Isla4.	30
Figura 10. Tamaño de partícula con respecto a A número de partículas de inulina por ml de solución y B porcentaje relativo al total de partículas (DLS).....	31
Figura 11 Seguimiento de la distribución de tamaño de partículas de inulina durante 15 días.....	32
Figura 12. Evolución de la reacción enzimática determinando el consumo de sustrato y síntesis de productos durante reacción enzimática.....	33
Figura 13. Distribución de tamaño por porcentaje de volumen de partículas a diferentes tiempos de reacción	34
Figura 14. Comportamiento cinético de la producción de inulina.....	35
Figura 15 . Micrografía utilizando TEM de nanopartículas de inulina producidas durante una reacción	36
Figura 16. Micrografía utilizando TEM de las nanopartículas de muestra de reacción Isla 4.....	37
Figura 17. Tamaño de partícula en función de temperatura y fuerza iónica.....	39
Figura 18. Correlación entre variables temperatura y fuerza iónica con respecto al tamaño promedio de nanopartícula obtenida al final de la reacción enzimática.....	40
Figura 19. Evolución de la reacción enzimática determinando el consumo de sustrato y síntesis de productos.....	42
Figura 20. Distribución de tamaño por volumen a diferentes tiempos de reacción	43
Figura 21. Comportamiento cinético de la producción de inulina.....	44
Figura 22. Cromatograma obtenido por HPLC-SEC del polímero de inulina sintetizado por Isla4	45
Figura 23. Micrografías utilizando TEM de np de inulina sintetizadas enzimáticamente a 4°C	46
Figura 24. Análisis de la citotoxicidad de inulina.	48
Figura 25. Densidad Óptica Máxima (D.O. M_{600nm}) de cepas probióticas utilizando fructosa, FOS Orafti, NP de Inulina, NP de Levana A y NP de Levana S como única fuente de carbono.....	50
Figura 26. D.O. M_{600nm} obtenida al utilizar como única fuente de carbono inulina, inulina-FOS y FOS.....	53

Índice de tablas

Tabla 1. Balance global del proceso de purificación de la enzima IslA4.....	20
Tabla 2 Características fisicoquímicas de la inulina de <i>Leuconostoc citreum</i>	28
Tabla 3. Porcentaje por molécula de anhidroalditoles derivados de una metilación reductiva de la inulina de <i>L. citreum</i>	29
Tabla 4 Valores de ET_{50} [h] calculados al evaluar el crecimiento de cepas probióticas empleando diferentes fructanas como única fuente de carbono.	51
Tabla 5 Concentración de inulina cuantificada al inicio y final de la fermentación.	54

ABREVIATURAS

DLS	Dispersión dinámica de luz
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
FOS	Fructooligosacáridos
FTF	Fructosiltransferasa
GP	Grado de polimerización
GPC	Cromatografía de permeación en gel (gel permeation chromatography)
HPAEC-PAD	Cromatografía de intercambio aniónico con detección de pulso amperométrico (high-performance anion exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (high pressure liquid chromatography)
HMW	Alto peso molecular (por sus siglas en inglés “high molecular weight”)
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
kDa	Kilodalton
D.O.M._{600nm}	Densidad óptica máxima
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida
TAE	Base tris, ácido acético y EDTA
TLC	Cromatografía en capa fina (thin layer chromatography)
U	Unidades de actividad enzimática
v/v	Volumen/volumen
w/v	Peso/volumen

Resumen

La inulina es un biopolímero natural constituido por unidades de fructosa, la cual presenta diferentes propiedades fisicoquímicas y funcionales dependiendo de su grado de polimerización y porcentaje de ramificación. Este polímero es utilizado en la industria alimenticia como fibra dietética soluble y como reemplazo de grasa/azúcar; además en la industria farmacéutica es empleado como estabilizador y excipiente. Dado que la inulina no es tóxica y puede formar hidrogeles, se ha utilizado como un sistema de liberación de fármacos de liberación lenta. Recientemente, en el grupo de polímeros biocompatibles se demostró que la inulina de alto peso molecular se estructura en forma de nanopartículas. Este hallazgo permite proponer la utilización de estas partículas como un nano-sistema de administración de biomoléculas basado en inulina. Sin embargo, es necesario desarrollar estudios que profundicen en la formación de nanopartículas, caracterización y propiedades de estos posibles nano-acarreadores. Así, el objetivo principal de este trabajo fue estudiar la formación de nanopartículas de inulina sintetizadas enzimáticamente por la inulosacarasa IsIA, una enzima multidominio de *Leuconostoc citreum*, así como sus propiedades biológicas y fisicoquímicas. Se determinó que esta inulina de alto peso molecular (3,000 kDa) contiene un porcentaje de ramificación de 10.25 y un valor de potencial Z de -2.15 ± 0.17 mV. Además, se determinó que existen 2.83×10^8 nanopartículas/ml de inulina en una solución de 5 g/L y un diámetro hidrodinámico promedio de 82.5 nm. Se demostró que las nanopartículas de inulina de alto peso molecular son autoensambladas durante la síntesis enzimática del polímero, registrando un tamaño promedio de partícula de 97 nm. Al monitorear reacciones enzimáticas a 30°C, se determinó que la concentración de agregación es de 15.17 g/L y que las nanopartículas formadas muestran una morfología esférica con índice de polidispersión de 0.06. Al estudiar el efecto de las condiciones de reacción sobre el tamaño de partícula, se demostró que la fuerza iónica no tiene una influencia significativa. Sin embargo, la temperatura de reacción si afectó el tamaño promedio de las nanopartículas. En reacciones en donde se disminuye la temperatura a 4°C se observaron

partículas de 131 nm (35% mayores que las observadas a 30°C). Bajo estas mismas condiciones se determinó una concentración de agregación de 6.78 g/L, siendo un valor menor a lo registrado a 30°C. Con respecto a las propiedades biológicas se puede concluir que las nanopartículas de inulina no informan citotoxicidad en cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC's) hasta una concentración de 200 µg/ml. Este resultado abre la puerta a su posible aplicación para generar sistemas de liberación controlada vía parenteral. Por otro lado, se sugiere que las nanopartículas autoensambladas de inulina de alto peso molecular pueden ser hidrolizadas y utilizadas, con baja eficiencia, como fuente de carbono por diversas cepas de bifidobacterias, lo que permite proponer su empleo como nano-acarreadores de fármacos sitio dirigidos al colon. Este trabajo sienta las bases para el desarrollo de futuras aplicaciones de las nanopartículas autoensambladas de inulina de alto peso molecular como posible sistema de nano-administración de fármacos.

1. Introducción

La inulina es un polímero de fructosa que se encuentra unido por enlaces $\beta(2-1)$ en su cadena principal y presenta ramificaciones a través de enlaces $\beta(2-6)$. Este polímero presenta diferentes propiedades fisicoquímicas y funcionales dependiendo de su grado de polimerización (GP) y porcentaje de ramificación (Ritsema & Smeekens, 2003; Fooks & Gibson, 2002). Sus enlaces glicosídicos $\beta(2-1)$ hacen a la inulina indigerible por humanos y por animales superiores debido a que no poseen enzimas capaces de degradarlos (Barclay *et al.*, 2010). Sin embargo, este polisacárido puede ser selectivamente fermentado por bacterias de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* presentes en el colon e intestino grueso, reportando beneficios a la salud y disminuyendo el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, de tracto gastrointestinal, cáncer de colon, osteoporosis y diabetes (Silva *et al.*, 2004; Korbelik & Cooper, 2007; Imran & Gillis, 2012).

Este polisacárido natural tiene diversas aplicaciones en el área de alimentos y farmacéutica. En la industria de alimentos es utilizada como fibra dietética soluble y como reemplazo de grasa o azúcar baja en calorías (Blecker *et al.*, 2001). En el caso de las aplicaciones farmacéuticas, este polímero es utilizado como estabilizador de vacunas y como medio de administración de fármacos de liberación lenta (Barclay *et al.*, 2010; Vervoort *et al.*, 1997). Esta última aplicación se debe a que la inulina no es tóxica y puede formar hidrogeles. Sin embargo, el polisacárido utilizado para la formación de estos hidrogeles debe ser modificado químicamente para mejorar su estabilidad y así permitir una liberación controlada del fármaco (Barclay *et al.*, 2010). Algunos informes recientes han demostrado que otro polímero de fructosa, la levana, es capaz de formar nanopartículas sin ser modificada químicamente, por lo que se ha sugerido su aplicación como nanoacarreadores de biofármacos (Nakapong *et al.*, 2013; Sezer *et al.*, 2011).

Recientemente, en nuestro grupo de investigación de polímeros biocompatibles, Quiñonez (2015) observó la presencia de nanopartículas de inulina de alto peso molecular (3,000kDa) después de su síntesis enzimática y purificación por métodos fisicoquímicos.

Dicha inulina fue producida por una inulosacarasa (IslA) de *Leuconostoc citreum*, así como por su versión truncada (IslA4) (del Moral *et al.* 2008; Olivares-Illana *et al.*, 2002).

Con base en este descubrimiento, enfocamos nuestro esfuerzo en estudiar la formación de nanopartículas de este polímero y sus propiedades biológicas para su posible aplicación como sistemas de liberación de compuestos bioactivos.

2. Antecedentes

2.1. Fructanas

Las fructanas son polímeros de fructosa unidos mediante enlaces glicosídicos que, dependiendo de su origen, presentan diferente grado de polimerización y porcentaje de ramificación. Según su tipo de enlace, las fructanas se clasifican en inulina o levana. La inulina es un polímero con enlaces $\beta(2\rightarrow1)$ en la cadena principal y ramificaciones con enlaces $\beta(2\rightarrow6)$ (**figura 1a**). Estas cadenas pueden terminar en una unidad de glucosa o en un residuo de fructosa (Stephen, *et al.*2006; Madrigal, *et al.*2007). Otra forma de clasificar a las fructanas es por su grado de polimerización. Una fructana propiamente dicha tiene un grado de polimerización (GP) mayor a 10 residuos, mientras que las fructanas con un GP menor a 10 fructosas son denominadas fructooligosacáridos (FOS). La inulina microbiana puede llegar a tener pesos moleculares superiores a 1,000 kDa (aproximadamente 10^3 residuos), mientras que la inulina producida en plantas tiene un GP entre 2 y 60 residuos de fructosa (Ebisu *et al.*1975; Vjin, *et al.*1999; Wada *et al.*2005). Entre las inulinas más empleadas se encuentran la inulina de achicoria e inulina de alto rendimiento (HP), cuyo GP es de 12 y 25, respectivamente. Por otra parte, la levana presenta enlaces $\beta(2\rightarrow6)$ en la cadena principal y ramificaciones $\beta(2\rightarrow1)$ (**figura 1b**), llegando a alcanzar más de diez mil residuos de fructosa en la cadena principal en levanas de origen microbiano (Hendry *et al.*1993).

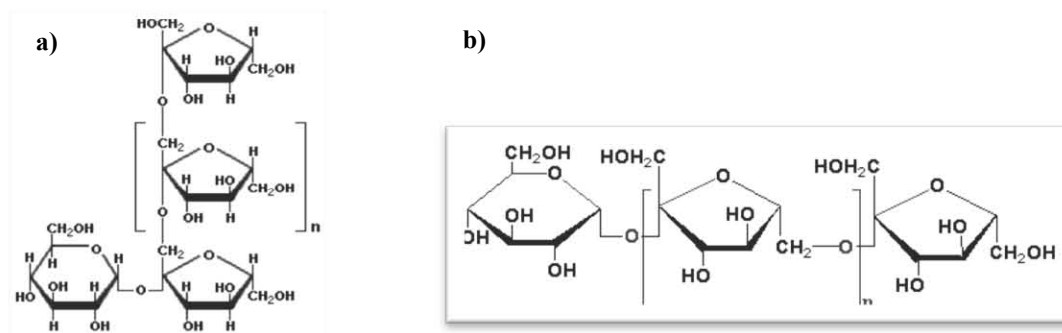


Figura 1. Representación estructural de las fructanas a) inulina y b) levana (Stephen, *et al.*2006; Madrigal, *et al.*2007).

En general, las fructanas son sintetizadas por enzimas conocidas como fructosiltransferasas (FTFs). La síntesis enzimática de estas fructanas se desarrolla a través de transferencias secuenciales de residuos fructosilo de la sacarosa a una molécula aceptora que puede ser la propia sacarosa, una cadena de polímero en crecimiento (actividad transferasa) o una molécula de agua (actividad hidrolítica), tal como se muestra en la **figura 2**. La levana es producida por enzimas denominadas levansacarasas (EC 2.4.1.10), mientras que la inulina es sintetizada por las inulosacarasas (EC 2.4.1.9) (Chambert *et al.*, 1976).

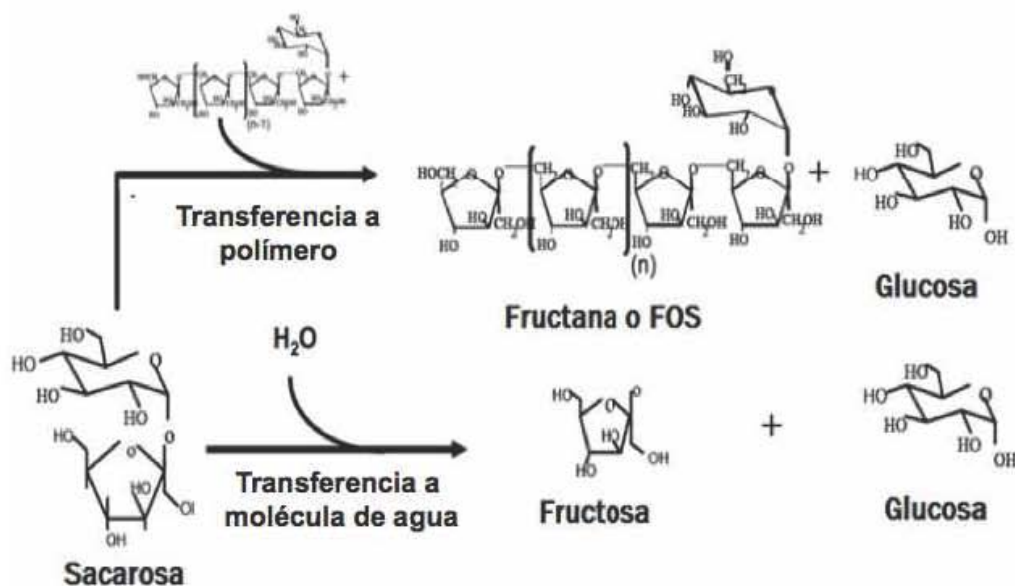


Figura 2 Reacciones catalizadas por las fructosiltransferasas (Chambert *et al.*, 1976).

2.2. Propiedades físicas y químicas de la inulina

Como se expuso con anterioridad, el grado de polimerización de esta fructana depende de su origen y puede determinar otras de sus características fisicoquímicas, entre ellas su solubilidad, morfología y reología. Normalmente, la solubilidad de esta fructana aumenta al disminuir el grado de polimerización. La solubilidad de la inulina de achicoria (GP 12), inulina HP (GP 25) y oligofruktosa (GP 4) en agua a 25 °C corresponde a 120, 25 y >750 g/L (Zimeri & Kokini, 2002). Esta solubilidad puede aumentar al incrementar la temperatura de la solución (Kim *et al.* 2001). Basados en el comportamiento de disolución, Cooper *et al.* (2011) identificaron cuatro isoformas semicristalinas en la inulina de achicoria (α , β , γ y

δ). La inulina β, producida por precipitación con etanol, es soluble a temperatura ambiente mientras que las otras isoformas requieren mayor temperatura para disolverse, siendo la inulina γ la de mayor peso molecular (8 a 16 kDa) y la menos soluble. Posteriormente, este mismo grupo de investigación observó que la isoforma semicristalina γ forma partículas menores a 2 μm de diámetro construidas por hojas laminares mostradas en la **figura 3** (Cooper *et al.*, 2013).

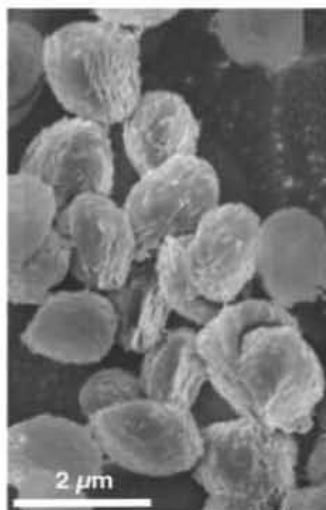


Figura 3. Micrografía utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM) de partículas de inulina (Cooper *et al.*, 2013).

Petrovsky *et al.*(2016) basados en ensayos físicos de dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS), espectrometría infrarroja (FTIR), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y modelaje, proponen que estas partículas de inulina están conformadas por cadenas de polímero ensambladas al azar. Se sugiere que esta conformación se debe a una organización helicoidal de la inulina, así como a las interacciones por enlaces de hidrógeno entre cadenas adyacentes, pudiendo formar hebras para después constituir nanocapas de dos dimensiones y finalmente micropartículas de tres dimensiones, como se muestra en la **figura 4**.

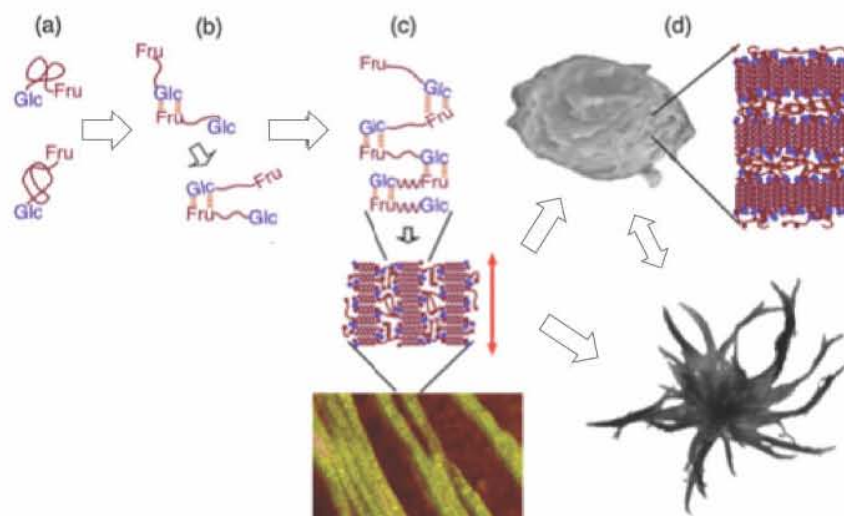


Figura 4. Representación esquemática de la formación de nanopartículas a) cadenas de inulina b) formación de enlaces de hidrógeno entre glucosa-fructosa c) hebras formadas de inulina d) hebras formando estructuras tipo esferulitas (Petrovsky *et al.*, 2016).

El grado de polimerización de la inulina influye directamente en las características reológicas como la viscosidad y la capacidad de gelificación. En un estudio realizado con inulina (GP promedio de 9 residuos) se determinó que ésta se comporta como un fluido newtoniano a baja concentración. La viscosidad newtoniana de esta solución osciló entre 2.0998 a 3.2439 mPas dependiendo de la temperatura (10 a 85°C) y el contenido del polímero (1 a 12%). Por lo que se pudo concluir que la viscosidad de la solución de inulina aumenta significativamente ($p < 0.05$) con el aumento del contenido de sólidos, mientras que ésta disminuye significativamente ($p < 0.05$) con un aumento de la temperatura (Kumar *et al.*, 2015). Por otro lado, existen estudios que demuestran que la viscosidad disminuye también por la adición de sales (Wada *et al.*, 2005).

Otra de las características dependientes del grado de polimerización es la capacidad de gelificación de la inulina la cual se basa en las interacciones que ocurren entre las cadenas disueltas en agua. En ocasiones estos geles pueden contener microcristales no disueltos, los cuales interactúan con otras partículas incrementando la fuerza del gel (Bot *et al.*, 2004; Franck *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2001). La viscosidad y la temperatura afectan la gelificación: entre mayor sea la viscosidad (dependiente del grado de polimerización), se forman geles

más estables (Kim *et al.*, 2001). De igual forma, Meyer *et al.* (2011) demostró que existe una concentración mínima de polímero necesaria para la gelificación y si ésta aumenta, la estabilidad de los geles incrementará. Dicha concentración dependerá del grado de polimerización de la inulina, al tener una solución de polímero con un GP de 9, se necesita una concentración mínima de 25% para formar un gel (Meyer *et al.*, 2011). Finalmente, el grado de polimerización también afectará el poder edulcorante, el cual disminuye a mayor longitud de la cadena (Roberfroid *et al.*, 2000). En general, gracias a los enlaces $\beta(2\rightarrow1)$, la inulina tienen un bajo aporte calórico, 1.5 kcal/g comparado con los carbohidratos digeribles (4.0 kcal/g) (Roberfroid *et al.*, 1999).

2.3. Aplicaciones de las fructanas.

Este polímero tienen amplias aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica. Dentro de la industria alimentaria, la inulina y los fructooligosacáridos (FOS) han sido clasificados como ingredientes funcionales y han recibido la aprobación de ser generalmente reconocidos como seguros (GRAS) por la FDA (Handa *et al.*, 2012). La inulina de achicoria (*Cichorium intybus*) es el principal tipo de fructana usada como aditivo alimentario (Barclay *et al.*, 2010). Gracias a la habilidad de las fructanas de formar geles estables y baja aportación calórica, éstas proveen la textura característica de la grasa, haciendo que se use como un sustituto de grasa baja en calorías, así como espesante y estabilizante de alimentos (Blecker *et al.* 2001).

Se han clasificado a las fructanas y FOS como agentes prebióticos, los cuales son definidos como compuestos no digeribles por el hospedero, pero fermentados anaeróbicamente por la microflora benéfica, estimulando así el crecimiento o bien la actividad de ésta, lo que contribuye a mejorar la calidad de vida del hospedero (Nines *et al.*, 1999; Roberfroid *et al.*, 2007). De estas fermentaciones se obtienen como productos algunos gases tales como hidrógeno, metano y CO₂, aminoácidos y ácidos grasos de cadena corta (acetatos, butirato, etc.), estos último causan la inhibición de microorganismos patógenos como *E. coli*, *Clostridium*, *Listeria* y *Salmonella* principalmente, reduciendo enfermedades

del tracto gastrointestinal (Robertfroid *et al.*, 2006; Homme *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha informado que el butirato en altas concentraciones, contribuye a reducir el riesgo de desarrollar cáncer de colon. Uno de los mecanismos propuestos es la modulación por parte del butirato sobre la transcripción de genes al inhibir a las histona deacetilasas y así evitar la proliferación de células cancerígenas (Kobayashi, Tan, & Fleming, 2003; Silva, Cooper, & Petrovsky, 2004). También se ha observado que los ácidos grasos de cadena corta aumentan la absorción del calcio, ya que estos productos disminuyen el pH luminal del intestino grueso, lo que incrementa el intercambio catiónico de H⁺ celular por el Ca²⁺ luminal (Coxam, 2007). Asimismo, se ha señalado que la producción de aminoácidos como la fenilalanina por parte de cepas probióticas, puede ser utilizada por el hospedero como un precursor de neurotransmisores tales como la dopamina, norepinefrina y epinefrina (Boer & Dijkhuizen, 1990). Otro de los efectos atribuidos a la ingesta de inulina es la disminución de lípidos séricos, triglicéridos y colesterol en sangre, lo cual contribuye a disminuir el riesgo de padecer alguna enfermedad cardiovascular contribuyendo positivamente a la salud del corazón (Causey *et al.*, 2000; Davidson *et al.*, 1998). Independientemente de los efectos que tiene la inulina sobre la microflora, este polímero ha mostrado tener un efecto inmunomodulatorio en el intestino al incrementar la inmunoglobulina (Ig) A y la producción de la interleucina-10; de igual forma se ha observado que incrementa la capacidad de producir interferon gama de las células mononucleares de sangre periférica (Roller *et al.*, 2004; Roller *et al.*, 2007).

Dentro de la industria farmacéutica, la inulina ha sido empleada como recubrimiento y aglutinante de tabletas (Hinrichs *et al.*, 2001; Hinrichs *et al.* 2005; Amorij *et al.*, 2007). También se ha utilizado en la administración de fármacos mediante diferentes vías como la oral, respiratoria y parenteral, ya sea subcutánea, intramuscular e intravenosa (**figura 5**).

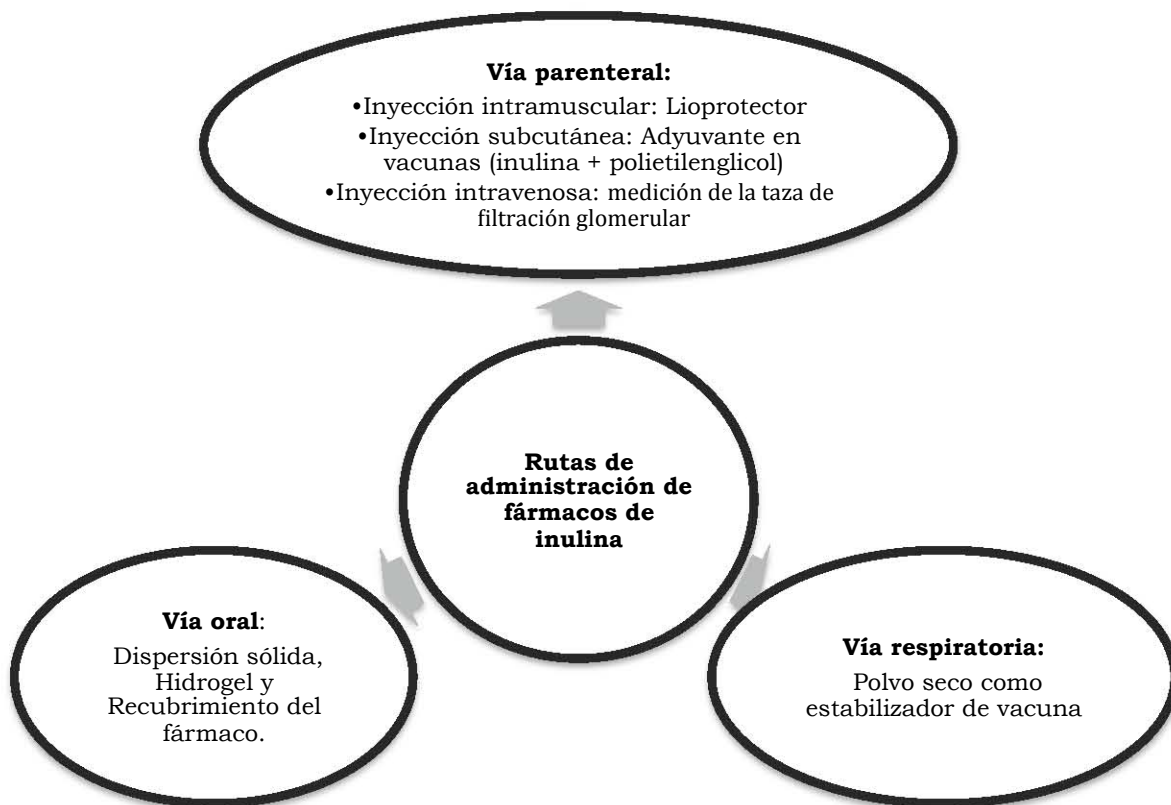


Figura 5. Vías de administración de los derivados de fármacos con inulina.

La ruta comúnmente utilizada es la administración oral, donde se encapsulan fármacos con inulina y son suministrados como una dispersión sólida (fármaco disperso en una matriz), un hidrogel o como un recubrimiento de fármaco. Con frecuencia el sitio blanco de liberación es el colon por lo tanto, la función del recubrimiento con inulina es proteger al fármaco del ambiente ácido del estómago y del tracto gastrointestinal superior (GI), para finalmente ser metabolizado por la microflora en el colon, liberando de esta forma al fármaco de interés (Dhirendra *et al.*, 2009; Mandracchia *et al.*, 2011; Lacorn *et al.*, 2010). Con respecto a la vía respiratoria, Audouy *et al.* (2011) indicó que la inulina es un crioprotector eficaz para estabilizar las vacunas con virus inactivados enteros al ser suministrados como polvo liofilizado (Amorij *et al.* 2007; Audouy *et al.*, 2011).

La inulina también ha sido administrada de forma parenteral, tanto por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular. Utilizando la vía intravenosa, la inulina se ha utilizado de

manera exitosa como método estándar para medir la tasa de filtración glomerular (Delanaye *et al.*, 2011). Se realizó una comparación entre esta vía y la subcutánea, empleando conjugados de inulina en combinación con polietilenglicol (PEG), demostrando que este conjugado presenta un mayor efecto de permeabilidad utilizando la vía subcutánea, debido a su tamaño y un largo tiempo de circulación (Sung *et al.*, 2010). Con respecto a la vía intramuscular, se utilizó la inulina δ incluida en la formulación de AdvaxTM, la cual fue empleada como vehículo para la vacuna inactivada contra la influenza H5N, optimizando la capacidad protectora de esta vacuna mediante el incremento de la inmunogenicidad y la reducción de la morbilidad (Petrovsky *et al.*, 2011).

2.4. Nanopartículas de fructanas

Los polímeros naturales han recibido cada vez más atención en el campo de los nano-sistemas de administración de fármacos. En particular, los polisacáridos parecen ser los materiales más prometedores en la preparación de transportadores nanométricos (tamaño aproximado de 100 nm), por lo que nuevas investigaciones están basadas en ellos (Liu, *et al.*, 2008). Estos polímeros han ganado interés rápidamente en todo el mundo gracias a sus propiedades fisicoquímicas, su biocompatibilidad y a su capacidad auto-degradante en el sistema humano, así como por su fácil obtención de fuentes naturales (Bowman, 2006; Goycoolea *et al.*, 2006). Sin embargo, sólo unos cuantos polisacáridos han sido reportados como materia prima en la preparación de nanopartículas tales como el pululano, dextrano, quitosano y celulosa así como la levana e inulina (Liu *et al.*, 2008; Lalatsa & Barbu, 2016).

Actualmente, solo existen publicaciones de formación de nanopartículas de inulina de bajo peso molecular modificadas químicamente, como la inulina-carboximetilada (Zhang *et al.*, 2014). Ésta fue utilizada para encapsular nanopartículas magnéticas (óxido de hierro), así como para la producción de nanopartículas modificadas con ibuprofeno (Zhang *et al.* 2014; Santiago-Rodríguez *et al.*, 2013). Otro ejemplo de nanopartículas de inulina son las generadas por Mohammad *et al.* (2015), quienes estudiaron un conjugado de inulina con curcumina para formar nanopartículas y así alcanzar la solubilidad requerida para la

liberación de este polifenol. En otro trabajo, se formaron micelas con un tamaño de 27.3 ± 1.3 nm constituidas por vitamina E e inulina para promover las propiedades hidrofóbicas de la curcumina (Tripodo & Pasut, 2015).

Existen informes recientes con respecto al uso de levana de alto peso molecular en la producción de nanopartículas. Sezer *et al.* (2011) utilizaron esta fructana (>1,000 kDa) para la nanoencapsulación de albúmina como proteína modelo, empleando el método de precipitación con sulfato de sodio (“salting out”). Estos autores demostraron que la agitación y la concentración de proteína determinan el tamaño de partícula y el grado de encapsulación, obteniendo partículas con un tamaño entre 200-537 nm y un porcentaje de encapsulación de 49 a 71%. Posterior a este trabajo, Nakapong *et al.* (2013) reportó el aislamiento de una enzima de *Bacillus licheniformis* RN-01 productora de levana de alto peso molecular (612 kDa) y observaron que durante la síntesis enzimática de esta fructana, ésta se autoensamblaba en nanopartículas de aproximadamente 50 nm de diámetro. Los autores realizaron ensayos de encapsulación de α -tocoferol durante la reacción enzimática, empleando únicamente una agitación constante logrando la formación de nanopartículas de 100 nm y una eficiencia de encapsulación del 2%.

Recientemente en nuestro grupo de investigación, Quiñonez (2015) observó la presencia de nanopartículas en muestras de ambas fructanas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y dispersión dinámica de luz (DLS). Después de la síntesis y liofilización de las fructanas estudiadas, éstas se resuspendieron en agua y se obtuvieron las micrografías mostradas en la **figura 6**. En el caso de las nanopartículas de levana C, levana de alto peso molecular producida por la enzima LevC de *Leuconostoc mesenteroides*, se observan partículas amorfas cuyo tamaño es de aproximadamente 120 nm (Quiñonez, 2015). Asimismo, se observó la presencia de nanopartículas de 100 nm en las muestras de inulina de alto peso molecular (3,000 kDa) producida por la inulosacarasa IslA de *Leuconostoc citreum* y la enzima IslA4, una versión truncada de ésta (Olivares *et al.*, 2002). En esta micrografía se observa que este polímero presenta una gran cantidad de nanopartículas, siendo consistentes con el tamaño determinado de 106 nm mediante DLS. Este es el primer

informe sobre la formación de nanopartículas de una inulina de alto peso molecular, lo cual tiene gran relevancia ya que podría ser utilizada para la generación de nano sistemas de liberación controlada.

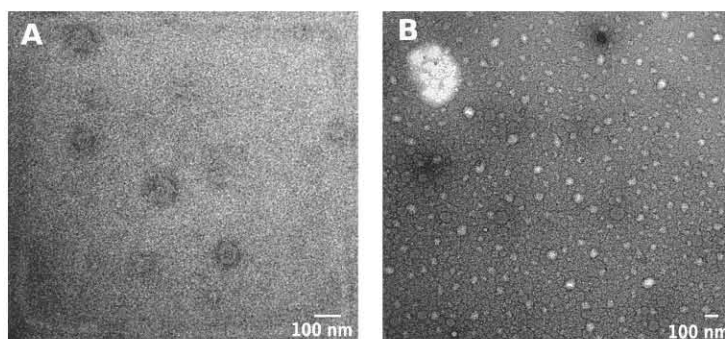


Figura 6. Micrografía de a) Levana *C. Leuconostoc mesenteroides* b) Inulina citreum. *Leuconostoc citreum* (Quiñonez, 2015)

Debido a estos antecedentes, se consideró importante realizar un estudio sobre la producción, conformación y características de estas nanopartículas. Tomando en cuenta lo analizado por Nakapong *et al.*(2013), sobre la capacidad de una fructana de autoensamblarse durante su síntesis, este proyecto pretende elucidar si la formación de las nanopartículas de inulina de alto peso molecular se realiza durante su síntesis enzimática. Aunado a esto, se analizaron las características fisicoquímicas y biológicas de estas nanopartículas con el objetivo a futuro de desarrollar un nano-sistema de liberación controlada de moléculas de interés.

3. Justificación

Debido al reciente descubrimiento de la formación de nanopartículas de fructanas de alto peso molecular, se tiene interés en estudiar la formación de nanopartículas de inulina, sus características fisicoquímicas y sus propiedades biológicas para su potencial aplicación como nano-sistemas de liberación de compuestos bioactivos.

4. Hipótesis

Las nanopartículas de inulina se autoensamblan durante la síntesis enzimática del polímero utilizando la inulosacarasa de *Leuconostoc citreum* CW28.

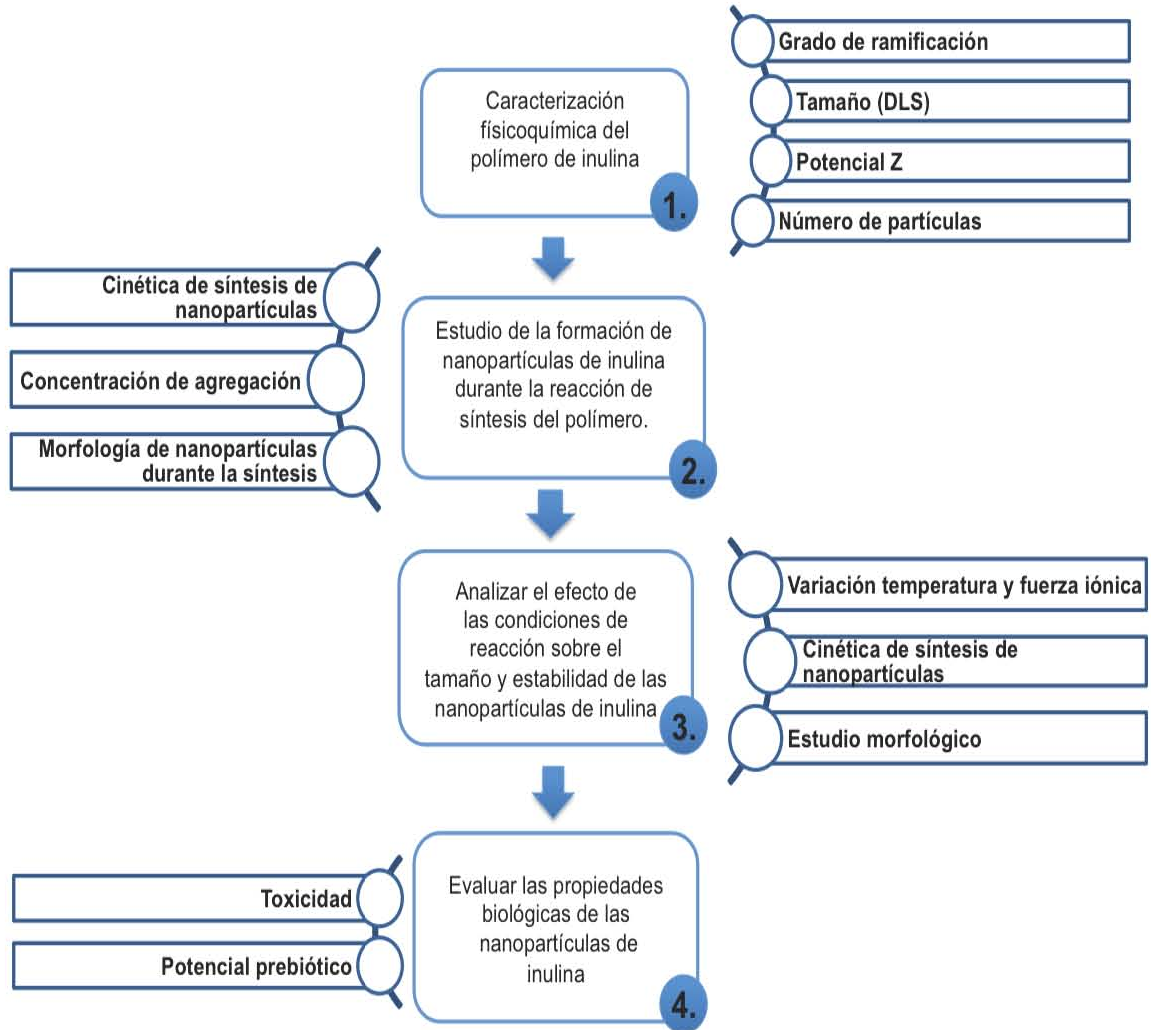
5. Objetivo general

Estudiar la formación de nanopartículas de inulina durante la síntesis enzimática del polímero y sus características fisicoquímicas y biológicas.

6. Objetivos específicos

1. Determinar las características fisicoquímicas de la inulina de alto peso molecular que forman nanopartículas.
2. Estudiar la formación de nanopartículas de inulina durante la reacción de síntesis enzimática del polímero.
3. Analizar el efecto de las condiciones de reacción enzimática sobre el tamaño de las nanopartículas de inulina.
4. Evaluar las propiedades biológicas de las nanopartículas de inulina.

7. Estrategia experimental



8. Materiales y Métodos

8.1. Expresión de la proteína recombinante IslA4.

Preparación de células electrocompetentes

Se propagó un pre-inóculo con las capas de *E. coli* BL21 (New England BioLabs) durante 12 h a 37 °C en medio LB (apéndice I) con agitación constante 200 rpm. Posteriormente, se realizó una fermentación de 1 L en medio LB utilizando 1% v/v de pre-inóculo (37°C, agitación constante 200rpm) y hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 medido a 600_{nm} equivalente a 4.8×10^8 células. Una vez alcanzada esta densidad, se cosecharon las células por centrifugación a 3,700 x g durante 15 min y se realizaron tres lavados de las células con glicerol al 10% estéril, para finalmente almacenar las células a -70 °C.

Transformación genética en cepa BL21 de *Escherichia coli*

Las transformaciones con el vector IslA4:pET28b superenrollado se realizaron usando células electrocompetentes de *E. coli* BL21 (New England Biolabs). Dicho vector contiene un gen de resistencia al antibiótico kanamicina, útil para la selección de clonas positivas; incluye también un origen de replicación, un promotor LacI que induce la transcripción del gen clonado. Las células transformadas se recuperaron en 500 µL de medio LB y se incubaron durante 1 h a 37 °C con agitación constante. Una vez terminado el tiempo de recuperación, el contenido celular fue distribuido en placas de agar LB con el antibiótico de resistencia (50 µg/mL kanamicina). Posteriormente, se incubaron a 37 °C por 12 h.

Expresión IslA4

Partiendo de las células transformadas, se propagó un pre-inóculo de 15 mL en medio LB con kanamicina (50 µg/mL) durante 12 h. Después, se realizó una resiembra (1.5 % v/v de pre-inóculo) en matraces tipo Fernbach (2.8 litros) con 1 L de medio LB adicionado con antibiótico y se incubó a 37 °C. Una vez que el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.6 unidades a 600nm, se realizó la inducción con 200 mM de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y se continuó la fermentación a 18 °C, en agitación constante (120 rpm) por 6 h (Olvera *et al.*, 2012). Una vez transcurrido el tiempo de inducción, las

células fueron separadas del sobrenadante por centrifugación a 3,700 x g y lavadas en 3 ocasiones con amortiguador de fosfatos pH 6, 100 mM adicionado con 1 mM de CaCl₂. Finalmente fueron resuspendidas en 6 mL de amortiguador adicionado con lisozima (1 g/L) para llevar a cabo la lisis celular. Para asegurar la lisis celular, las muestras fueron congeladas con ayuda de dióxido de carbono (CO₂) sólido y posteriormente se realizó una sonicación con 3 pulsos de 15 seg con descansos de 30 seg. El sobrenadante fue obtenido por centrifugación a 3,700 x g durante 10 min a 4 °C.

8.2. Métodos generales de purificación y análisis de proteínas

Purificación de IsIA4

Una vez obtenida la enzima recombinante, se purificó mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC por sus siglas en inglés, Fast protein liquid chromatography) en un equipo ÄKTA prime (Amersham Pharmacia Biotech) empleando una columna de intercambio catiónico CM-sepharose. La elusión se realizó con un gradiente de fosfatos de 0.1 a 1.0 M pH 6.0, flujo de 3 ml/min y presión 0.4 mPa. Para concentrar la enzima, se transfirieron las fracciones eluidas a filtros moleculares (Millipore corte molecular 10,000 Da). Se centrifugó por 20 min a 3,700 x g y se añadió buffer de acetatos 100mM pH 6 adicionado con 1 mM de CaCl₂ a los filtros moleculares.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las proteínas fueron separadas por electroforesis en un gel (1 mm de espesor) de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), de acuerdo con el método de Laemmli (1970). La electroforesis se llevó a cabo en una cámara mighty small II para geles de 8x7 cm. El gel concentrador se realizó con bis acrilamida al 5% p/v, mientras que el gel separador se llevó a cabo a una concentración del 10% p/v; la formulación de los geles se muestra en el apéndice I. Para la separación por migración de las proteínas se generó un campo eléctrico a 20 mA. Se analizó 50 µg de proteína que se mezclaron con amortiguador de carga para proteínas (apéndice I) adicionado con 10% de β-mercaptoetanol. Una vez terminada la electroforesis, los geles fueron lavados en agua, con el fin de eliminar el SDS presente, enseguida se utilizó el colorante GelCode Blue Stain

Reagent (Thermo Scientific) por 20 min para teñir las proteínas y se lavaron en agua por un periodo de 30 min.

Con el objetivo de corroborar la purificación de la enzima IslA4 se elaboró un gel de poliacrilamida siguiendo la metodología antes descrita. En la **figura 7** se puede observar una única banda con un peso molecular de 65 kDa indicando la pureza de la enzima IslA4.

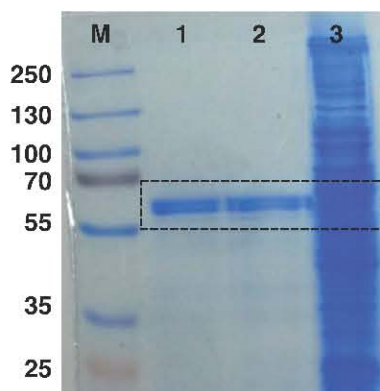


Figura 7. Gel SDS-PAGE del ensayo de purificación de la enzima IslA4. Carril 1 y 2 muestra obtenida de la purificación por columna de intercambio catiónico. Carril 3 muestra de extracto.

Cuantificación de proteína

La proteína total del extracto enzimático fue cuantificada mediante el sistema Protein Assay (Bio-Rad) basado en el método de Bradford (1976), utilizando una curva de seroalbúmina bovina como estándar. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Determinación de actividad enzimática

La actividad IslA4 se determinó mediante la cuantificación de azúcares reductores liberados mediante la técnica de Miller o DNS (ácido dinitrosalicílico) (Miller, 1959). La reacción enzimática se llevó a cabo en presencia de 100 g/L de sacarosa en amortiguador de acetatos 0.1 M pH 6.0 adicionado con 1 mM de CaCl₂ a una temperatura de 30°C y en un volumen de reacción de 600 µL con agitación constante (300rpm). Los azúcares reductores se determinaron midiendo la absorbancia a 540 nm. Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que libera un µmol de azúcares reductores medidos

como glucosa por min. El rendimiento de la actividad se define como la actividad existente después de la purificación expresada como porcentaje de la actividad del extracto crudo. La actividad del extracto inicial se toma como el 100%. Por otro lado, el factor de purificación mide el incremento en pureza y se obtiene dividiendo la actividad específica, calculada al final de la purificación, por la actividad específica del extracto inicial (Stryer *et al.*, 2012).

Los resultados de los ensayos de purificación de la enzimas IslA4 se muestran en la **tabla 1**, donde se observa que existe un rendimiento de actividad del 10.36% y una producción de 22.74 U/ml . Los ensayos se realizaron por triplicado.

Tabla 1. Balance global del proceso de purificación de la enzima IslA4

Muestra	Volumen final (mL)	U/mL	Unidades totales (U)	Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	U/mg proteína	Rendimiento de actividad (%)	Factor de purificación
Extracto enzimático	50.00	4.39	219.50	4.70	234.78	0.93		1.00
Enzima purificada	1.00	22.74	22.74	0.88	0.88	25.87	10.36	27.67

8.3. Métodos generales de identificación y análisis de productos.

Análisis de productos

La fructosa, glucosa y sacarosa liberadas de la síntesis enzimática de inulina se cuantificaron en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) marca Waters con un detector de índice de refracción (Waters 410) y una columna Prevail Carbohydrate ES (4.6 x 250 mm) a una temperatura de 30°C, usando acetonitrilo:agua (75:25) como fase móvil a un flujo constante de 1 mL/min. El cálculo de la relación hidrólisis/transferencia, así como la conversión de la sacarosa, se realizaron usando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Actividad total} = \text{Conversión de sacarosa}$$

$$\% \text{ Hidrólisis} = (\text{fructosa/glucosa}) * 100\%$$

$$\% \text{ de transferencia} = 100\% - \text{Hidrólisis}$$

Se determinó la cantidad de polímero que produce la enzima por cromatografía de permeación en gel (GPC). Las determinaciones se llevaron a cabo en un equipo marca Waters con un detector de índice de refracción (Waters 410) en un sistema de dos columnas conectadas en serie: Ultrahydrogel Linear (7.8x300mm) y Ultrahydrogel 500 (7.8x300mm) con un índice de exclusión entre 0.5 y 10,000 kDa a una temperatura de 30°C. Como fase móvil se utilizó nitrato de sodio 0.1 M con un flujo de 0.8 mL/min. Se utilizaron como estándares dextranas de diferente peso molecular. Las muestras se filtraron antes de su análisis (0.22 µm).

8.4. Determinación del porcentaje de ramificación de polímero

Esta determinación fue llevada a cabo en las instalaciones del departamento de Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Viena bajo la supervisión del Dr. Werner Praznik y Dra. Renate Loeppert. Para este ensayo se utilizó inulina de alto peso molecular previamente sintetizada en la planta piloto del Instituto de Biotecnología en un bioreactor de 30 L (Biostat UD, 30L), precipitada con etanol y liofilizada. La inulina liofilizada fue disuelta en dimetilsulfóxido (CH₃)₂SO para formar iones de alcóxido de los azúcares, la solución se alcalinizó con polvo deshidratado de hidróxido de sodio (NaOH), se agitó y se metiló con yoduro de metilo. Para sofocar la reacción se añadió agua y los derivados se colocaron en cloruro de metilo (CH₂Cl₂) previamente adicionado con sulfato de sodio (Na₂SO₄). Después de eliminar la sal de secado, la fase orgánica se evaporó bajo nitrógeno N₂. Para metilar los carbohidratos la reacción se llevó a cabo bajo condiciones anhidras, por lo que todos los reactivos y solventes fueron secados con anticipación. Las muestras secas metiladas se disolvieron en una pequeña cantidad de cloruro de metilo (CH₂Cl₂), trimetilsilano (CH₃)₃SiH como medio reductor y trimetilsililtrifluormetansulfonato (CH₃)₃SiOSO₂CF₃ como catalizador, se agitaron durante la noche. Se añadió ácido acético anhidro (CH₃CO)₂O y se agitó por 2h. Se adicionó cloruro de metilo CH₂Cl₂ y se neutralizó con una solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio NaHCO₃, se lavó varias veces con agua destilada y la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro Na₂SO₄. Después de eliminar la sal, la fase orgánica se evaporó con N₂. Los anhidroalditoles derivados fueron detectados por cromatografía de gas-líquido (GLC) acoplada a un detector

por ionización de llama GLC/FID. La identificación por GLC fue realizada utilizando el equipo Shimadzu GC 2010 con una columna capilar (DB-1701; 30 m, 0.25 mm i.d.: 0.25 μ m film thickness; Agilent, Co.), helio como gas acarreador y la detección por ionización de llama utilizando el programa: 80 \rightarrow 135°C a 10°C/min, 135 \rightarrow 155°C a 2°C/min, 155 \rightarrow 200°C a 3°C/min, 200 \rightarrow 260°C a 5°C/min, inyector de temperatura de 230°C y detector de temperatura a 270°C. En la **figura 8** se observa un cromatograma obtenido, donde se observan diferentes señales de acuerdo a la metilación y acetilación de cada molécula. De esta forma se puede diferenciar fructosas lineales, ramificadas y fructosas terminales, así como la glucosa terminal.

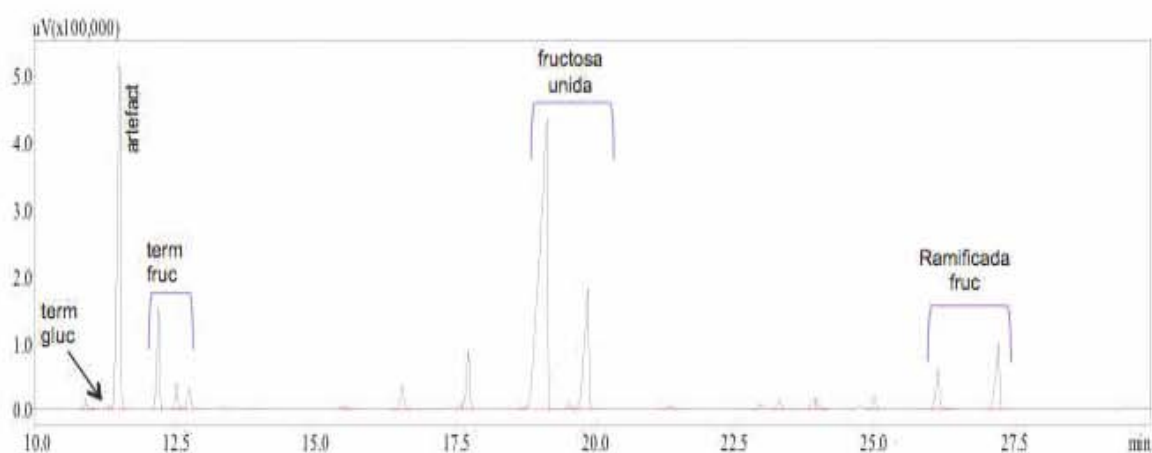


Figura 8. Cromatograma obtenido por GLC/FID de la inulina metilada y acetilada de *Leuconostoc citreum*.

8.5. Reacción enzimática para la producción de inulina

Las reacciones se llevaron a cabo empleando 0.5 U/mL de enzima Isla4 y una concentración de sacarosa de 100g/L en un amortiguador de acetatos 0.1 M pH 6.0 adicionado con 1 mM de CaCl₂, temperatura de 30°C con agitación constante. La reacción se detuvo sometiendo las reacciones a ebullición durante 5 min para inactivar la enzima. Se identificaron y cuantificaron los productos de reacción y se determinó el tamaño de partícula de estas muestras.

Ensayo del efecto de las condiciones de reacción sobre el tamaño de las nanopartículas de inulina

Para cada reacción se utilizó una concentración de sacarosa de 100g/L y 0.5 U/mL de inulosacarasa Isla4 en un amortiguador de acetatos pH 6.0 adicionado con 1 mM de CaCl₂ variando la concentración de acetato de sodio 50mM, 100mM y 200 mM (fuerza iónica μ de 0.005, 0.1 y 0.2 respectivamente) a temperaturas de 30°C, 18°C y 4°C con agitación constante. Estas reacciones fueron monitoreadas en cuanto al tamaño de partícula así como al perfil y cuantificación de productos de reacción.

8.6. Métodos de análisis de nanopartículas

Se determinó el tamaño de las nanopartículas, midiendo el diámetro hidrodinámico por dispersión de luz hidrodinámica (DLS) empleando el equipo Malvern Instrument Zetasizer 2000 y mediante el equipo el equipo Malvern Zetasizer NanoZS (ZEN 3600, Malvern Instruments, Worcestershire, UK) utilizando un laser rojo ($\lambda = 632.8$ nm). La dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés de "Dynamic light Scattering"), es una técnica fisicoquímica empleada para la determinación de tamaño de partículas en suspensión o macromoléculas en solución tales como proteínas o polímeros (Estelrich *et al.*, 1991; Ford *et al.*, 1970).

El valor de potencial Z (ζ) fue determinado mediante un análisis de dispersión de luz de fases aunado a un electroforesis láser Doppler (M3-PALS) en solución reguladora de acetatos 100mM pH 6 utilizando el equipo ZetaSizer NanoZS, utilizando una celda capilar plegada.

Cuantificación de nanopartículas en solución

El recuento de las nanopartículas por tamaño se realizó utilizando un análisis de rastreo de nanopartículas (NTA) usando un sistema NanoSight™ LM10 equipado con un láser verde LM14 (535nm) y una cámara Andor (Andor-DL-658-OEM). El rayo láser pasa a través de la cámara de la muestra, y las partículas en suspensión en el camino del haz dispersan la luz de tal manera que pueden verse fácilmente a través de un microscopio de 20

aumentos a una distancia de trabajo lejana con ayuda de una cámara de video montada. La cámara captura un archivo de video de las partículas en estado de movimiento browniano. El software de análisis de rastreo de nanopartículas (NTA) realiza un seguimiento de muchas partículas individualmente y utiliza la ecuación Stokes-Einstein para calcular sus diámetros hidrodinámicos. Ecuación Stokes-Einstein: $D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}$ donde **D** es la constante de difusión (m²/s) , **η** viscosidad dinámica (Pa·s), **r** radio (m), **k_B** constante de Boltzmann (1.3806488×10⁻²³ J/K) (Lindsay, 2009).

En este caso, las partículas de inulina se diluyeron 1:100,000 en agua miliQ antes del análisis. Este ensayo fue realizado por el Dr. Francisco M. Goycoolea en la Universidad de Münster, Alemania.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Se aplicó un agente de contraste para observar las muestras de los productos que resultaron de la reacción enzimática utilizando la inulosacarasa IsLA4 mediante TEM. Se utilizó la técnica de tinción negativa (TN), la cual permite determinar la presencia de partículas de tamaño nanométrico. En este trabajo se utilizó la TN para muestras obtenidas a diferentes tiempos de las reacciones enzimáticas que resultaron al detener la reacción en agua hirviendo durante 5 minutos. Se depositaron 5 microlitros de cada una de las muestras en rejillas de cobre con membrana de Formvar y carbón evaporado. La rejilla se deja flotar durante 1 minuto sobre una pequeña gota de la muestra del producto de la reacción enzimática, del lado del carbón evaporado. A continuación se elimina el exceso de muestra con un papel de filtro y se deja flotar sobre una gota (5µL) de acetato de uranilo 2% durante 1 min. El exceso de uranilo se retira también con la ayuda de un papel de filtro. Las rejillas con las muestras contrastadas por el método de tinción negativa se observaron en un microscopio electrónico de transmisión marca ZEISS modelo Libra a 120 Kv con cámara digital Gatan.

8.7. Pruebas de citotoxicidad

En colaboración con la Dra. Rebeca Pérez Morales del Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango, se realizó un estudio de citotoxicidad por triplicado del polímero de inulina a concentraciones de 25, 50, 100, 150 y 200 µg/ml, aplicando el tratamiento de exposición a 24 horas. Se realizaron los ensayos en cultivo de linfocitos humanos (PBMC's), obtenidas de un pool de 3 muestras de mujeres clínicamente sanas, con un intervalo de edad entre 28 – 37 años. Las células fueron purificadas por gradiente de densidad con linfoprep. Se sembraron ~ 50,000 células para poder determinar el efecto de la inulina de *Leuconostoc citreum* sobre la viabilidad celular. Se utilizó el ensayo de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Este ensayo se basa en la reducción metabólica del MTT realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido (Denizot & Lang, 1986).

Se realizó la curva estándar a una absorbancia de 540 nm con respecto al número de células sembradas (por triplicado), para hacer la transformación de absorbancia a número de células. El porcentaje de viabilidad se obtuvo utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{D.O. \text{ células tratadas} \times 100}{D.O. \text{ células control}}$$

Se realizó una prueba ANOVA de un factor para comparaciones múltiples con prueba *ad hoc* de Dunnet que compara los tratamientos contra el grupo control sin tratamiento, utilizando el software GraphPad Prism 7.01. Se utilizó como control positivo de muerte celular un tratamiento de 24 horas con etanol al 96%.

8.8. Determinación de potencial prebiótico

Las fructanas utilizadas en este apartado fueron donadas por el estudiante de doctorado Raga-Carbajal. Las levanas fueron sintetizadas enzimáticamente empleando la levansacarasa SacB de *B. subtilis str. 18* la cual, dependiendo de las condiciones de reacción,

puede sintetizar levanas con distribuciones de pesos moleculares distintos. En este caso se empleó 100 g/L de sacarosa y 0.1 U/mL sintetizando solamente una población con un peso molecular promedio de 2,300 KDa (levana A). Para purificar la levana A, se realizó una precipitación con 1 volumen de etanol, se dializó con agua durante dos días empleando membranas con corte de 10 kDa, siguiendo lo informado por Porras-Domínguez, *et al.* (2015). Otro de los sustratos utilizados para este estudio fue la levana sintetizada por la levansacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, este polímero tiene una distribución de peso molecular promedio de 2,200 KDa (levana S). Las condiciones de reacción y purificación fueron las descritas por del Morales-Arrieta *et al.* (2006).

Se determinó el potencial prebiótico de la inulina sintetizada por *Leuconostoc citreum* monitoreando cada hora el crecimiento de 13 cepas probióticas mediante la medición de la D.O._{600nm} usando el equipo Bioscreen C (Oy Growth Curves Ab Ltd- Helsinki, Finland). La preparación de las cepas fue la siguiente: se lavaron las cepas tres veces con una solución salina de fosfatos (PBS) suplementada con 0.5 g/L de hidrocloreuro de cisteína para después resuspenderlas en medio MRS sin fuente de carbono (glucosa). Se inocularon las cepas con una D.O._{600nm} inicial de 0.1 y se agregó cada polímero en solución para tener concentración final de éste del 1% en un volumen total de fermentación de 200 µl. Se utilizaron microplatos de 96 pozos (Honeycomb) incubándolos a una temperatura de 37°C por 48 horas. Se midió la D.O._{600nm} cada hora después de una ligera agitación de 15 segundos. En el caso del control negativo, no se agregó alguna fuente de carbono y se utilizaron las mismas condiciones de fermentación y como control positivo se utilizó 5g/L de fructosa.

Se calculó el valor de ET₅₀, el cual equivale al tiempo en alcanzar la mitad de la Densidad Óptica Máxima _{600nm} con respecto a la fructosa (Müller *et al.*, 2016). El valor de D.O._{600nm} mínimo de la fructosa se denomina “a” y el valor máximo “a+b” por lo que el valor medio “c” es igual a “a+b/2”. Por lo que, el tiempo al registrarse este valor “c” en la curva de crecimiento utilizando como fuente al sustrato de interés, será el ET₅₀.

Con la finalidad de observar una posible inducción en la hidrólisis de inulina en fructosa o FOS se realizó un ensayo utilizando la cepa *B. longum* subsp. *infantis* ATCC

15697. Esta cepa se activó en 10 mL de medio MRS adicionado con 0.5 g/L de L-cisteína. El medio se desgasificó con CO₂ y posteriormente se esterilizó en viales sellados. El cultivo duró 24 horas a 37 °C y 200 rpm. Posteriormente, se creció en 50 mL de medio con la siguiente composición (g/L): Bacto peptona (Difco) 2, extracto de levadura (Difco) 2, L-cisteína 0.5, Tween 80 2 mL/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.01, CaCl₂ · 6H₂O 0.01, KH₂PO₄ 0.04, NaCl 0.1 y K₂HPO₄ 0.04. Al medio se le adicionó buffer de fosfatos 100 mM y se ajustó el pH a 6.8, se alicuotó en viales sellados, se desgasificó con CO₂ y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Cada fructana: inulina, inulina y fructosa, inulina y FOS Orafti (FOS tipo inulina), se esterilizó por filtración usando filtros de polivinilo fluorado (Millex-GV Millipore) de 0.22 µm y se añadió al medio esterilizado para tener una concentración final de 5g/L. En el caso del control, se sustituyó la fructana por 5 g/L de glucosa. Las fermentaciones se llevaron a cabo en 50 mL, por triplicado. El inóculo se realizó con 2.5 mL de un cultivo crecido por 24 horas en medio MRS. Se midió la D.O. _{600nm} aproximadamente cada 6 horas utilizando el espectrofotómetro Beckman DU650 y las muestras se centrifugaron por 15 minutos a 20,000 x g cuyo sobrenadante se calentó a 95°C y se almacenó a -20°C hasta su análisis de perfil de productos.

9. Resultados y discusión

9.1. Propiedades fisicoquímicas del polímero sintetizado por la inulosacarasa asociada a pared celular de *Leuconostoc citreum*.

Se han realizado diferentes estudios sobre las características fisicoquímicas de la inulina producida por *Leuconostoc citreum*, las cuales son resumidas en la **tabla 2** (del Moral *et al.*, 2008; Quiñonez, 2015). Sin embargo, es de suma importancia determinar el grado de ramificación para comprender otras propiedades de este polímero como la solubilidad y la conformación tridimensional (Wolff *et al.*, 2000). De igual manera fue de nuestro interés determinar la cantidad de partículas en solución así como el potencial Z. Por tal motivo, decidimos complementar esta caracterización utilizando la inulina sintetizada enzimáticamente por la Inulosacarasa IslA asociada a la pared de las células completas de *L. citreum* (Ortiz Soto *et al.*, 2004).

Tabla 2 Características fisicoquímicas de la inulina de *Leuconostoc citreum* (del Moral *et al.*, 2008; Quiñonez, 2015).

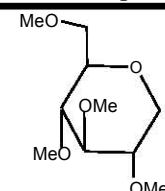
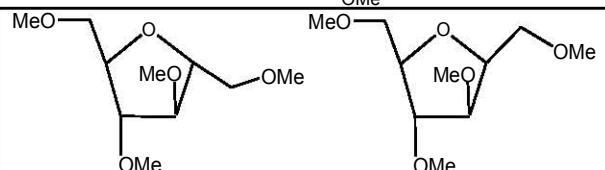
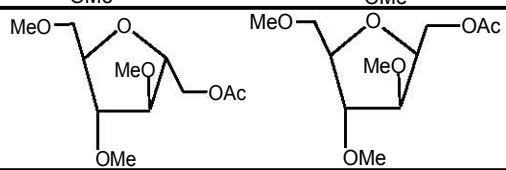
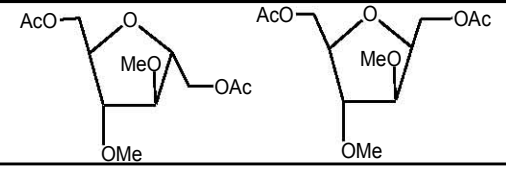
Característica	Valor
Peso molecular	90 a 4 400 kDa
Peso promedio molecular	3,000 kDa
Grado de polimerización	18, 500
Tipo de enlace cadena principal	β (2-1)
Tipo de enlace ramificaciones	β (2-6)
Diámetro hidrodinámico	112.3 \pm 5nm
Índice de polidispersión de tamaño	0.069

9.1.1. Determinación del grado de ramificación de la inulina

Para desarrollar este análisis, el polímero se sometió a un proceso de metilación, hidrólisis y acetilación, obteniendo como resultado anhidroalditoles derivados, los cuales fueron identificados y cuantificados por medio de una cromatografía de gas-líquido (GLC). Dependiendo de la posición de la metilación y acetilación en estos residuos, se definió cuál

era su posición dentro del polímero: glucosa terminal, fructosa ramificada, fructosa terminal y fructosa lineales $\beta(2-1)$. Considerando los datos mostrados en la **tabla 3** y un peso molecular de 3,000 kDa se determinó que este polímero de inulina de alto peso molecular contiene aproximadamente $\sim 18,519$ fructosas, de las cuales $\sim 14,730$ son fructosas lineales, $\sim 1,858$ fructosas ramificadas y $\sim 1,899$ fructosas terminales. El número de ramificaciones debe de ser cercano al número de fructosas terminales, en este caso la variación observada puede deberse a que se trabaja con un polímero polidisperso.

Tabla 3. Porcentaje por molécula de anhidroalditoles derivados de una metilación reductiva de la inulina de *L. citreum*.

Molécula	%	Estructura química
Glucosa terminal	0.17	
Fructosa terminal α y β	10.25	
Fru-lineal-2,1 α y β	79.54	
Fructosa-ramificada α y β	10.03	

De acuerdo a la tasa relativa de los residuos fructosil terminales, la inulina de *Leuconostoc citreum* tiene un porcentaje de ramificación del 10.25%, por lo que se sugiere que este polímero conforma la estructura mostrada en la **figura 9**, donde existe una ramificación cada 8 fructosas. Este porcentaje de ramificación es mayor al obtenido por Wolf *et al.*(2000) quienes caracterizaron una inulina de alto peso molecular (20,000 kDa) sintetizada *in vitro* por una fructosiltransferasa de *Streptococcus mutans*, obteniendo un porcentaje de

ramificación del 6.1 %, y una inulina (distribución de peso molecular 14.9 a 5,000 kDa) producida por *Aspergillus sydowi* IAM 2544, con un porcentaje de ramificación de 5.4% (Wolff *et al.*, 2000).

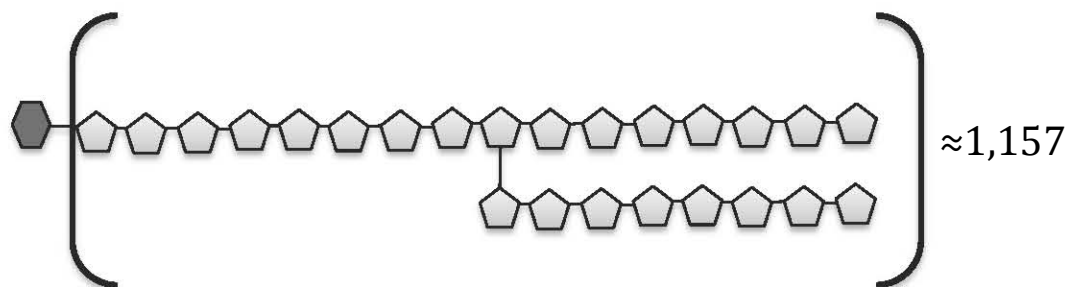


Figura 9. Estructura de inulina sintetizada por inulosacarasa Isla4.

9.1.2. Determinación del número de nanopartículas.

Con el objetivo de cuantificar el número de nanopartículas presentes en una muestra de inulina en solución (5g/L), se realizaron análisis empleando la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) y el software “Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)” el cual permite visualizar partículas de 10 a 1000 nm individualmente. Se detectaron 2.83×10^8 nanopartículas/mL con una distribución de tamaño de 32.5 a 232.5 nm en una muestra con una concentración de 5 g/L de inulina de *Leuconostoc citreum* (**figura 10**). Dentro de esta distribución, las partículas de 82.5 nm son las que se encontraban en mayor proporción (15%), cuya concentración fue de 42.61×10^6 nanopartículas/ml. Este es el primer reporte de cuantificación de nanopartículas de inulina de alto peso molecular. Dicha distribución fue similar al utilizar la misma concentración de inulina (5 g/L) y el equipo Zetasizer donde se realizó una cuantificación relativa al total de partículas detectadas.

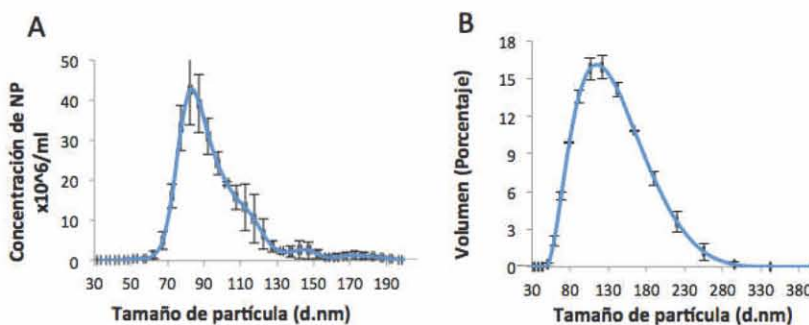


Figura 10. Tamaño de partícula con respecto a **A** número de partículas de inulina por ml de solución y **B** porcentaje relativo al total de partículas (DLS).

9.1.3. Potencial Z

El potencial Z es un valor que representa el comportamiento electroestático de una partícula coloidal en el medio donde se encuentre, ese potencial se ha asociado con la capacidad de agregación de las partículas en solución, por lo que se considera un parámetro de estabilidad (Sundar *et al.*, 2010). Por esta razón se consideró importante realizar la determinación del potencial Z de la inulina de *L. citreum*. Para este análisis se analizó una solución de 5 g/L de inulina disuelta en buffer de acetatos 100 mM y pH 6 empleando la técnica electroforesis Doppler con láser. Los valores obtenidos del potencial Z con esta técnica fueron de -1.55 ± 0.47 mV, lo que indica una ligera carga negativa. Considerando que la inulina es un polímero neutro, no se esperaba obtener un valor que muestre la existencia de algún tipo de carga, por lo que se sugirió que dicho valor se podía adjudicar a la presencia de algún componente cargado negativamente unido a la superficie de éstas nanopartículas. Debido a que la inulina proviene de una síntesis enzimática utilizando células completas, es probable que alguna proteína aún unida a este polímero fuera la responsable de este cambio de carga. Por tal motivo, se cuantificó la proteína presente en la muestra mediante el método de Bradford. La cantidad de proteína presente en la muestra fue de $9.52 \times 10^{-3} \pm 0.28$ mg/ml. A pesar de ser una cantidad relativamente baja de proteína, ésta podría ser la responsable de la ligera carga negativa registrada en las nanopartículas. En general, las partículas cuyo potencial Z se encuentra en el intervalo entre +30mV y -30 mV se consideran como partículas que tendrán una tendencia a agregarse (Wongsagonsup *et al.*, 2005). Tomando en cuenta que el potencial Z de las nanopartículas de inulina se encuentra dentro de este intervalo (-1.55 ± 0.47 mV), sugiriendo que estas partículas son inestables, se decidió realizar un seguimiento de estas partículas por 15 días (**figura 11**). Se analizó diariamente su tamaño por DLS, observando que el diámetro hidrodinámico no varió, lo que sugiere que a pesar del valor de potencial Z, estas partículas son estables y no tienden a agregarse.

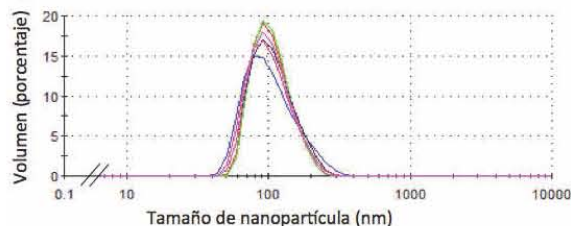


Figura 11 Seguimiento de la distribución de tamaño de partículas de inulina durante 15 días. Las mediciones se realizaron cada 60 horas aproximadamente (medición por línea).

9.2. Estudio de la formación de nanopartículas de inulina durante la reacción de síntesis del polímero.

El objetivo principal de este trabajo fue elucidar si las nanopartículas de inulina se forman durante la síntesis enzimática y si es así, determinar en qué momento de la reacción son generadas. Se decidió realizar este estudio empleando la inulosacarasa IslA4, versión troncada de la enzima IslA producida por *L. citreum* CW28, que debido a la eliminación de las regiones N y C-terminal no presenta proteólisis (del Moral *et al.*, 2008). Existen reportes que revelan que la forma troncada IslA4, a pesar de ver afectada su actividad transferasa, retiene la capacidad para producir inulina del mismo peso molecular que la enzima silvestre (del Moral *et al.*, 2008).

Para analizar a detalle la evolución de la reacción y la síntesis de productos generados, se realizó la cuantificación del sustrato consumido, glucosa liberada, polímero sintetizado, así como la estimación de la fructosa transferida para la formación de fructooligosacáridos (FOS). Dichas reacciones se realizaron empleando enzima IslA4 pura, considerando una concentración de sustrato 100 g/L de sacarosa y 0.5 U/mL de enzima a una temperatura de 30°C.

En la **figura 12** se puede observar la primera fase de la reacción enzimática, donde el consumo de sacarosa alcanzó un 75% en 45 minutos, fue la etapa con mayor velocidad de consumo de sustrato alcanzando un valor de 98 g/L·h. En el caso de los productos de transferencia, existió una baja producción de FOS (3.71 g/L) con respecto a la producción

de inulina (19 g/L), esta última registró una velocidad de aparición de 34.5 g/L·h. Por otro lado, la relación de la concentración de fructosa (17.1 g/L)/glucosa (36.3 g/L) libre ayuda a calcular el porcentaje de hidrólisis que esta enzima promueve. Durante la fase inicial se alcanzó un 47% de hidrólisis. En este caso, la velocidad de aparición de glucosa y fructosa fue de 53 g/L·h y 35 g/L·h respectivamente.

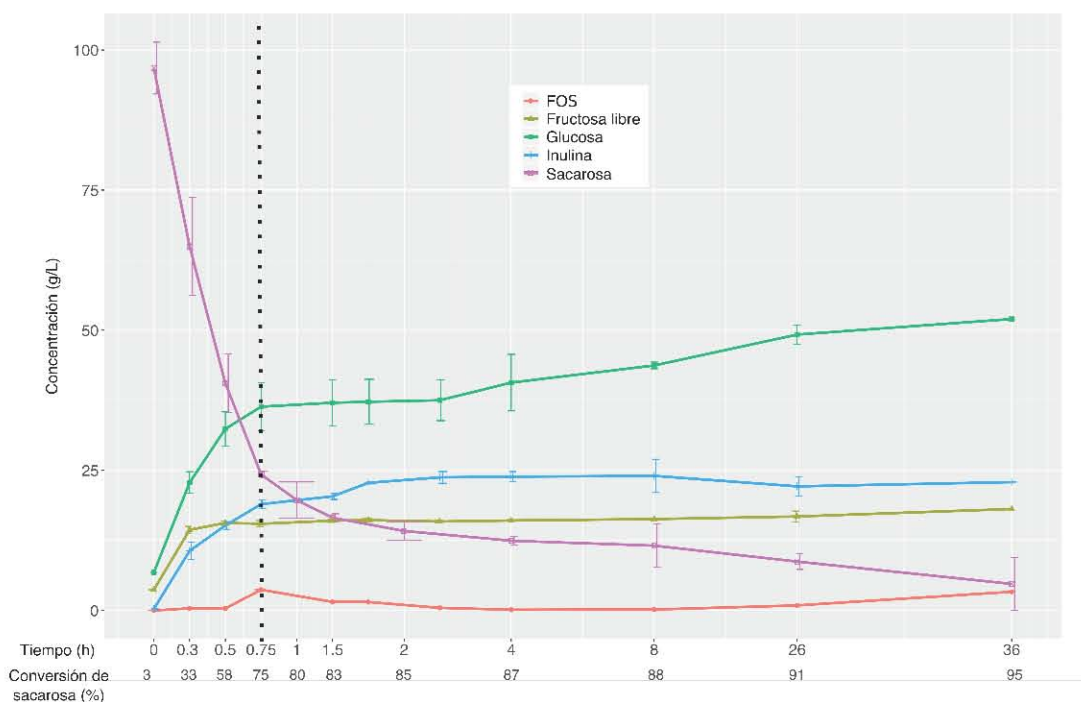


Figura 12. Evolución de la reacción enzimática determinando el consumo de sustrato y síntesis de productos durante reacción enzimática a 30° C, empleando 100g/L de sacarosa y 0.5U/ml de IsIA4, en una solución reguladora de acetatos 100mM pH6.

Durante la etapa final, entre 80 y 95% de conversión de sustrato, se observó una velocidad de consumo de sacarosa de 0.3 g/L·h. Este valor nos indica que la mayoría de la sacarosa fue consumida durante la primera etapa. Por otro lado, la concentración de la inulina varió entre 20 y 24 g/L, por lo que su producción fue menor que en la fase inicial siendo la velocidad de aparición de 0.3 g/L·h durante esta última etapa. En cuanto a la producción de FOS, se observó una variación de 0.91 a 3.3 g/L al final de reacción y una concentración de inulina de 22.91 g/L (**figura 12**).

En general, durante la reacción enzimática se observó una alta producción de inulina, lo cual concuerda con lo reportado por Peña Cardeña *et al.*, 2015 quien indica una baja

producción de FOS a condiciones de reacción similares a las empleadas en este trabajo. Cabe mencionar que no existen reportes de un seguimiento enzimático de la aparición de los productos de hidrólisis y transferencia. Sin embargo, en el estudio cinético de la producción de FOS de inulina sintetizados por *Lactobacillus gasseri* DSM20604 se observa que durante la primera hora se sintetiza un 75% aproximado de producto y se consume aproximadamente el 50% de la sacarosa; la reacción total se llevó a cabo por 32 horas (Díez-Municio *et al.*, 2013). Esto concuerda con lo observado, ya que se consumió la mayor parte del sustrato durante la primera hora de reacción.

Con el fin de elucidar si durante la síntesis enzimática del polímero se lleva a cabo la formación de las nanopartículas de inulina, se monitorearon reacciones a través de la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS).

En la **figura 13** se puede observar el seguimiento del tamaño de partícula durante las reacciones enzimáticas. Se analizaron muestras al inicio de la reacción y a 33% de conversión de sacarosa. En ambas muestras no se observaron agregados a pesar de haber producción de inulina. La distribución observada con un promedio 0.62 nm corresponde al diámetro hidrodinámico de la sacarosa (Kaszuba *et al.*, 2008). A partir de los 30 minutos de reacción (58% de conversión) se percibe la aparición de nanopartículas, las cuales aumentan su tamaño conforme continua la reacción. Esta observación sugiere que existe algún factor, posiblemente la concentración de polímero, que pudiera promover el autoensamblaje de estas nanopartículas.

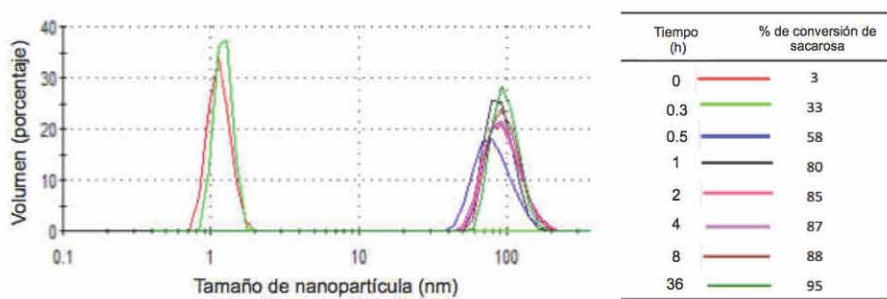


Figura 13. Distribución de tamaño por porcentaje de volumen de partículas a diferentes tiempos de reacción empleando 0.5 U/ml de Isla4 y 100 g/L sacarosa a una temperatura 30°C en una solución reguladora de acetatos 100 mM.

Al realizar un análisis entre el tamaño de partícula y la producción de polímero durante la reacción enzimática, se pudo determinar que a 30 min de reacción la cantidad de polímero producido alcanzó 15.17 g/L como se muestra en la **figura 12**. Como ya se mencionó, fue en este tiempo cuando se detectó la aparición de nanopartículas, registrando un diámetro hidrodinámico promedio de 67.33 nm (**figura 14A**). El tamaño de estas nanopartículas de inulina y la concentración de polímero, en las mediciones subsecuentes, fue aumentando hasta llegar a un valor aproximado de 97 nm y una concentración final de 22.91 g/L de inulina como se puede observar **figura 14B**.

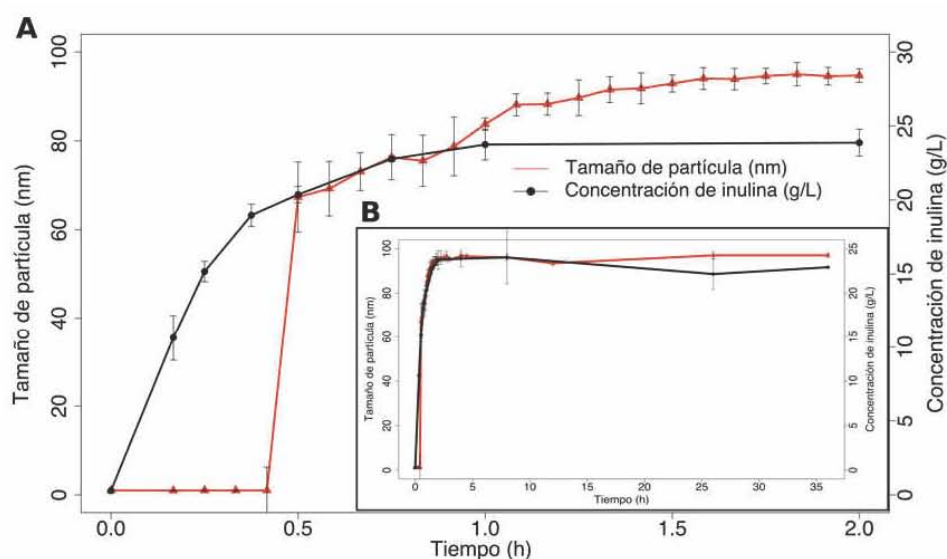


Figura 14. Comportamiento cinético de la producción de inulina empleando 0.5 U/ml de Isla4, 100 g/L sacarosa a una temperatura 30°C en solución reguladora de acetatos 100 mM pH 6 (línea negra). Evolución del diámetro hidrodinámico promedio de las partículas de inulina con respecto al tiempo de reacción (línea roja). **A** Comportamiento cinético durante las primeras dos horas de reacción **B** Comportamiento cinético durante 36 horas de reacción.

La repentina aparición de las nanopartículas de inulina durante la reacción de síntesis de polímero sugiere que pudiera existir una concentración crítica de agregación. Se propone que la concentración de agregación es la cantidad de polímero necesaria para el ensamble de las nanopartículas poliméricas (Moulik *et al.*2009). En nuestro caso de estudio, la concentración de agregación para el ensamble de las nanopartículas es de 15.17 g/L (**figura 14**). La identificación de una concentración de agregación ya había sido reportada para el autoensamble de nanopartículas de inulina de bajo peso molecular al disolver este polímero

en agua. La concentración de agregación para esta fructana fue de 0.072 g/L, generando nanopartículas de 180 nm (Moulik *et al.*2009). Esta concentración es dos órdenes de magnitud menor a la observada en el presente trabajo, esta discrepancia probablemente se deba a la diferencia de solubilidades entre ambas inulinas a causa de su grado de polimerización.

Una vez observada la aparición de nanopartículas autoensambladas de inulina durante la síntesis enzimática de este polímero, se propuso realizar la caracterización morfológica que estas estructuras adquieren durante dicha síntesis enzimática.

9.2.1. Caracterización morfológica de las nanopartículas de inulina sintetizadas enzimáticamente.

Para determinar la morfología de las nanopartículas autoensambladas de inulina, diversas muestras de reacción fueron visualizadas mediante microscopía electrónica de transmisión.

En la **figura 15** se presentan únicamente las micrografías de muestras a tiempo final de la reacción (36 h), correspondientes a 95% de conversión y 22.9 g/L de inulina. En estas micrografías se pueden observar partículas esféricas de diversos tamaños, los cuales se encuentran dentro de la distribución de tamaño determinado por DLS.

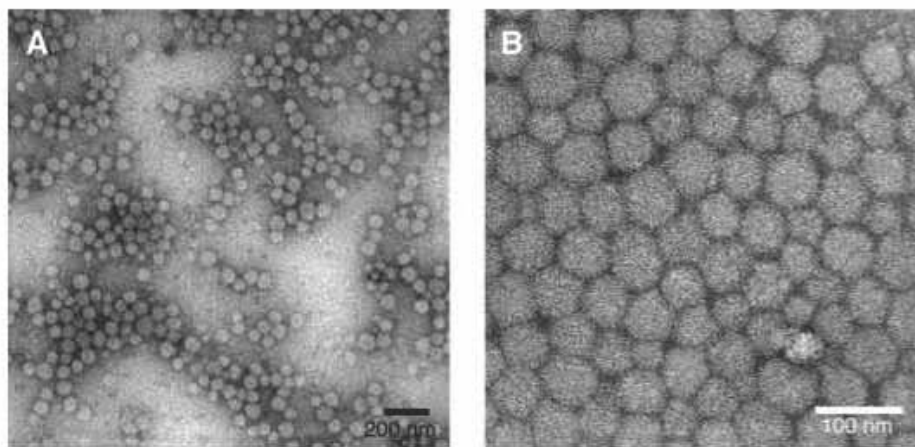


Figura 15 . Micrografía utilizando TEM de nanopartículas de inulina producidas durante una reacción utilizando Isla 4 0.5 U/ml, 100 g/L sacarosa a 36 horas de reacción. Magnificación A) 10k B) 40k.

En la **figura 16** se observan dos nanopartículas aisladas de 260 y 280 nm donde, además de ver claramente su morfología circular, se pudo observar una estructura cóncava sugiriendo que estas nanopartículas podrían estar huecas. Sin embargo, es necesario corroborar dicha característica morfológica, por lo que se propone como perspectiva analizar la superficie de la nanopartícula mediante microscopía electrónica de barrido y estudiar el espesor de las capas poliméricas a través de la elipsometría espectroscópica (Albella Martín, 2003).

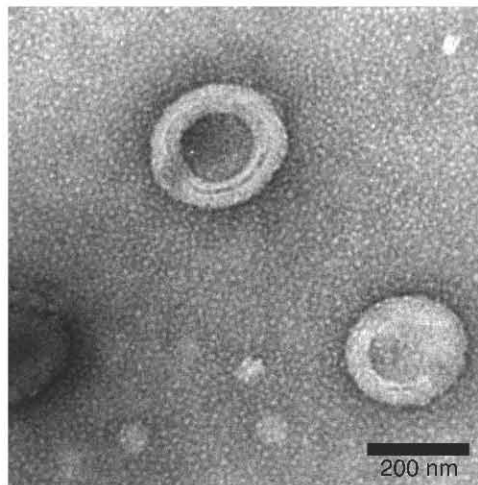


Figura 16 .Micrografía utilizando TEM de las nanopartículas de muestra de reacción IsIA 4 0.5 U/ml, 100 g/L sacarosa 30°C, 65% de conversión de sustrato. Magnificación 20k.

Con base en estos resultados se puede afirmar que la inulina de alto peso molecular producida por la enzima IsIA4 es capaz de autoensamblarse durante la síntesis enzimática formando nanopartículas de morfología esférica.

9.2.2. Efecto de las condiciones de reacción sobre la formación y tamaño de las nanopartículas de inulina.

Al observar el autoensamblado de las partículas de inulina durante su síntesis enzimática, fue de nuestro interés estudiar algunas variables que pudieran afectar la formación de dichas nanopartículas. Entre los factores fisicoquímicos que afectan la formación de nanopartículas de polisacáridos se encuentran la temperatura y la fuerza iónica. Se optó por la variable

fuerza iónica, debido a que los cationes pueden afectar las propiedades conformacionales de las nanopartículas (Li *et al.*, 2004). Por otro lado, la temperatura puede afectar las características reológicas de la inulina, como la viscosidad que a su vez puede cambiar las características de las nanopartículas (por ejemplo, tamaño de partícula, morfología superficial, etc.) (Sharma *et al.*, 2016).

Con el objetivo de analizar el efecto de la fuerza iónica en el tamaño de las nanopartículas de inulina, se llevaron a cabo reacciones enzimáticas variando la concentración de la solución reguladora a 0.05 M, 0.1 M y 0.2 M. Estas concentraciones fueron empleadas debido a que concentraciones más altas afectan drásticamente la actividad enzimática (datos no mostrados). Asimismo, se analizaron reacciones a 4°C, 18°C y 30°C, ya que se ha observado que al aumentar la temperatura ($\geq 35^\circ\text{C}$) esta enzima pierde completamente su actividad (del Moral, 2008). Se determinó el diámetro hidrodinámico promedio al final de cada reacción enzimática mediante DLS.

En reacciones a una temperatura de 30°C, reduciendo la fuerza iónica (0.1 M a 0.05 M) se reportó una disminución del 0.72% en el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas y al aumentarla (0.1M a 0.2M) disminuyó su tamaño en 3.3% (**figura 17**). Por otro lado, al reducir la fuerza iónica (0.1M a 0.05M) y la temperatura a 18°C, se observó una disminución en un 3%; a esta misma temperatura pero aumentando la fuerza iónica (0.1M a 0.2M) el tamaño de las nanopartículas aumentó en 5%. Finalmente, al realizar los ensayos a una temperatura de reacción de 4° y reduciendo la fuerza iónica (0.1M a 0.05M) se observó una disminución del 8% en el diámetro hidrodinámico de la partícula y al aumentarla (0.1M a 0.2M) el tamaño de la partícula incrementó en un 4%. Estos resultados muestran una variación mínima en el tamaño de partícula al modificar la fuerza iónica.

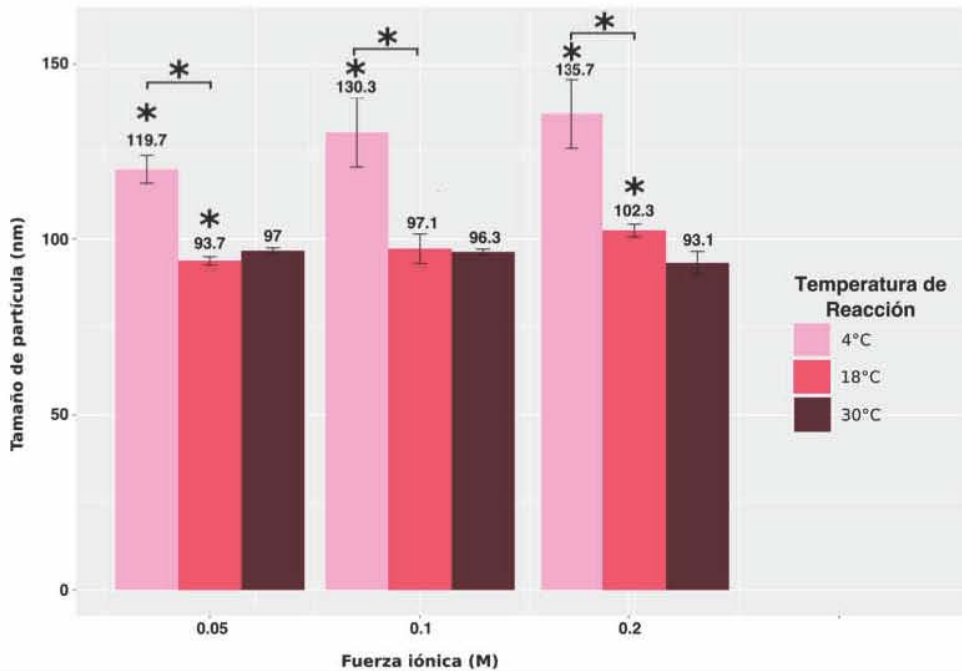


Figura 17. Tamaño de partícula en función de temperatura y fuerza iónica. * significativamente diferente ($p < 0.05$) al tamaño de partícula sintetizada a 30°C o entre ellas.

Al analizar el efecto de la temperatura en el tamaño de nanopartícula se observó que al reducir de 30 a 18°C y manteniendo constante la fuerza iónica a 0.05M, se observa que el diámetro hidrodinámico disminuye significativamente ($p < 0.05$) en un 3.5%. Sin embargo, al reducir la temperatura de 30 a 4°C, el tamaño de nanopartícula aumenta en 23%. Por otro lado, al disminuir la temperatura de 30 a 18°C y una fuerza iónica de 0.1M, se observó un aumento de tamaño en un 0.82%, mientras que al reducir la temperatura de 30 a 4°C el tamaño de partícula aumentó significativamente ($p < 0.05$) un 27%. Finalmente, disminuyendo la temperatura de 30 a 18°C con una fuerza iónica constante de 0.2 M, se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) del tamaño de partícula del 8.9% y al reducirla a 4°, con esta misma fuerza iónica, el tamaño de partícula aumentó un 32%. Con estos resultados podemos afirmar que a una menor temperatura de reacción aumenta el promedio del diámetro hidrodinámico de las partículas.

Se realizó un estudio de correlación entre variables utilizando el programa R Studio. El valor del índice de correlación obtenido en este tipo de estudios varía en el intervalo $[-1, 1]$, donde el signo indica el sentido de la relación. Si $r = 1$, existe una correlación positiva

perfecta. El índice indica una dependencia total entre las dos variables denominada relación directa: cuando una de ellas aumenta, la otra también lo hace en proporción constante (Govinden, 1985).

El valor obtenido para la correlación entre la fuerza iónica y el tamaño de partícula fue cercano a cero, demostrando que no existe una correlación significativa entre las dos variables para este intervalo de concentración de sales (**figura 18**). Existen reportes contradictorios en cuanto a este efecto, por un lado Nakapong *et al.* (2013), Carneiro-da-Cunha *et al.* (2011) y Barry & Halsey (1963) indican que existe una influencia de la concentración de sales en la ruptura de los enlaces de hidrógeno, que posiblemente estén involucrados en el autoensamblaje de las partículas. Por otro lado, Li *et al.* (2004) observaron una correlación muy baja, no significativa entre el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas de galactomananos y la fuerza iónica empleando diferentes concentraciones de cloruro de sodio (0.1 y 0.05% w/v). Consideramos que estos resultados contradictorios dejan de manifiesto la necesidad de realizar estudios a fondo que analicen el efecto de la fuerza iónica en las interacciones entre las moléculas de azúcares de los polisacáridos y específicamente en la conformación de nanopartículas.

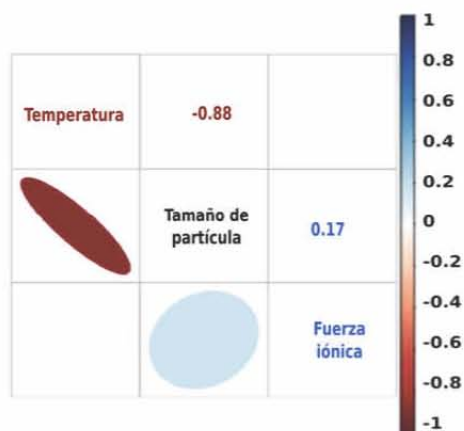


Figura 18. Correlación entre variables temperatura y fuerza iónica con respecto al tamaño promedio de nanopartícula, obtenida al final de la reacción enzimática utilizando el software R Studio.

Con respecto a la correlación que existe entre la temperatura y el tamaño de partícula, se observó una correlación negativa alta, lo que demuestra que la temperatura (en un intervalo de 4 a 30°C) es un factor con fuerte influencia en la formación de las nanopartículas. He, *et al.* (2007) menciona que la temperatura puede afectar la nucleación y el crecimiento de las partículas. Este crecimiento es usualmente más lento a menor temperatura, favoreciendo el proceso de estabilización cinético de las nanopartículas, lo que promoverá partículas más grandes y estables. Asimismo, existen reportes que demuestran que al reducir la temperatura, disminuye la velocidad de reacción de la enzima IslA4 y por lo tanto, el rendimiento en la producción de polímero (del Moral *et al.*, 2008).

9.2.3. Análisis de la reacción de síntesis de polímero de inulina y la formación de nanopartículas a 4°C.

Debido a que a baja temperatura se observó un cambio significativo en el tamaño de la nanopartícula, se decidió estudiar la cinética de reacción de síntesis de polímero a esta condición. Para desarrollar este estudio, se analizaron a detalle las reacciones de síntesis de polímero utilizando las mismas condiciones que en los ensayos a 30°C y cuantificando el sustrato consumido, así como los productos de reacción.

Con la finalidad de realizar una comparación entre las reacciones enzimáticas a 30 y 4°C, se definieron nuevamente las fases con respecto al porcentaje de conversión de sustrato. La primera fase se delimitó entre 0 y 73%, lo cual fue el valor más cercano al estimado en la primera fase de la reacción a 30°C (75%). Como se puede observar en la **figura 19**, esta fase comprendió 12 horas de reacción, donde la producción de FOS fue de 3.28 g/L y de inulina 17.93 g/L, siendo el 74 % de lo producido a 30°C. En este caso, durante la primera etapa de reacción se registra una velocidad de 15.72 g/L·h. Con respecto a la aparición del polímero, se observa una velocidad de aparición de 4.2 g/L·h. La glucosa y fructosa durante las primeras horas exhibieron una velocidad de aparición de 4.55 y 2.88 g/L·h respectivamente. Estos valores son menores a los observados durante la reacción enzimática a 30 °C. Aunado

a esto, el porcentaje de hidrólisis fue de 73% siendo este mayor que el registrado a 30°C que fue de 38%.

Durante la fase final (de 12 a 36 horas de reacción) se alcanzó un porcentaje de conversión de sacarosa del 76%, el cual es un valor menor en un 20% comparándolo con el mismo tiempo de reacción a 30°C. En este caso la velocidad de desaparición de sustrato fue de 0.17 g/L·h sugiriendo que, a pesar de no haberse consumido todo el sustrato, la velocidad se redujo de manera considerable. La cantidad de FOS fue de 3.06 g/L, mientras que la producción de polímero aumentó ligeramente de 17.93 a 19.54 g/L. Con respecto a la aparición de inulina, se registró una velocidad de 0.06 g/L·h, siendo éste un valor menor registrado en las últimas horas de la reacción llevada a cabo a 30 °C. Se registró un valor de 0.025 g/L·h y 0.023 g/L·h para la velocidad de aparición de glucosa y fructosa, siendo valores menores a los registrados a 30 °C. De igual forma, el porcentaje de hidrólisis fue de 56%, siendo mayor al compararlo con la reacción a 30°C cuyo valor fue de 38.7%, lo que sugiere que la temperatura pudiera estar afectando la especificidad del tipo de productos de la reacción.

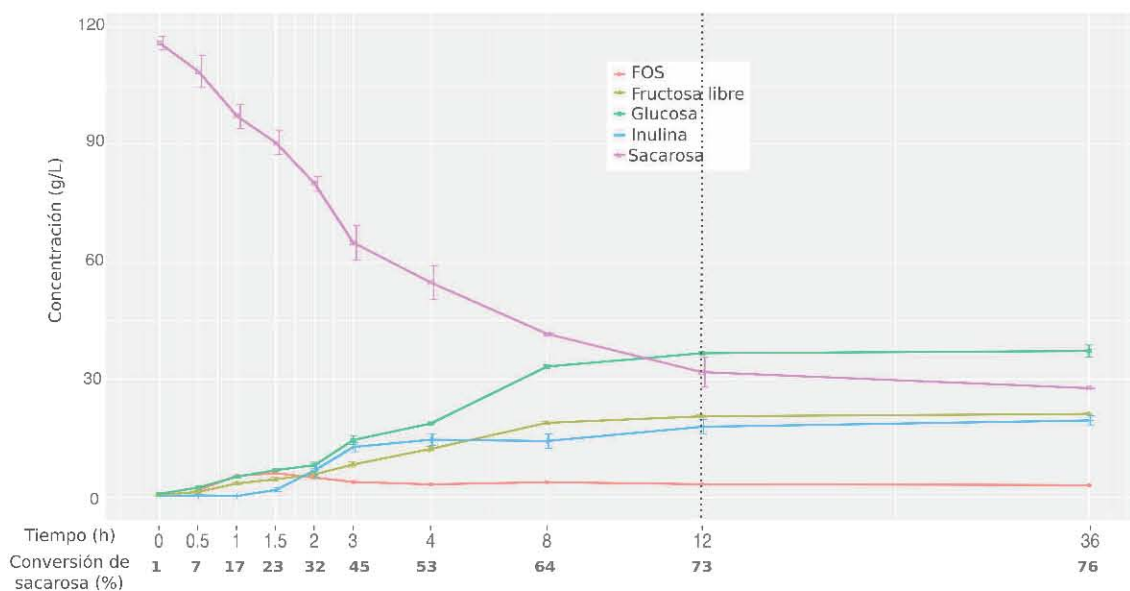


Figura 19. Evolución de la reacción enzimática determinando el consumo de sustrato y síntesis de productos durante reacción enzimática a 4° C, empleando 0.5U/ml de IslA4, en una solución reguladora de acetatos 100mM pH6.

Se realizó un seguimiento del tamaño de partícula durante la reacción enzimática. En la **figura 19**, se muestra la distribución de tamaño de partícula donde en los primeros tiempos de reacción 0, 30 min y 1 h, el tamaño promedio se mantuvo en 1 nm. A partir de las 2 h, se observa la aparición de nanopartículas con una distribución de tamaño de 40 a 300 nm y un tamaño promedio de 83.08 ± 5.95 nm. Esta distribución se va ajustando conforme al tiempo hasta ser constante y alcanzar valores entre 80-200nm y un promedio de partícula de 131 nm, el cual es mayor que el registrado a 30°C.

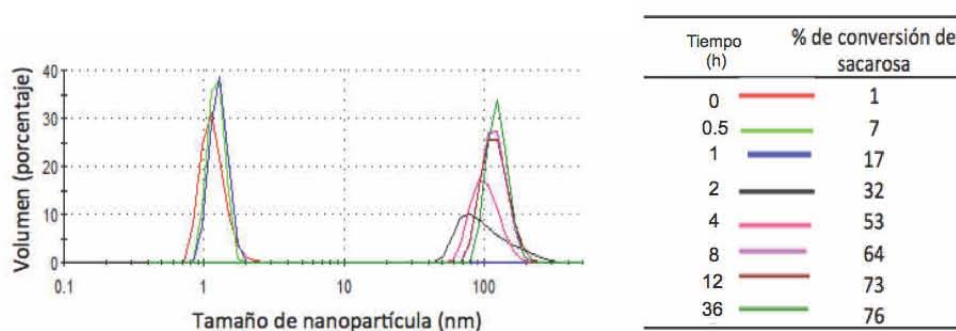


Figura 20. Distribución de tamaño por volumen a diferentes tiempos de reacción empleando 0.5 U/ml de IslA4 y 100 g/L sacarosa a una temperatura 4°C.

En la **figura 21**, se observa el promedio del tamaño de las partículas, así como la concentración de inulina con respecto al tiempo. A estas condiciones de reacción también se registró la posible concentración de agregación, en este caso se observó la aparición de las nanopartículas al registrarse una concentración de 6.78 g/L de inulina a un porcentaje de conversión de sustrato de 32%. Esta concentración fue 44% menor a la registrada a 30 °C donde a los 30 minutos de haber iniciado la reacción se cuantificaron 15.17 g/L a 58% de conversión de sustrato, con un tamaño de partícula inicial menor de 67.33 nm alcanzando un tamaño final de 131 nm.

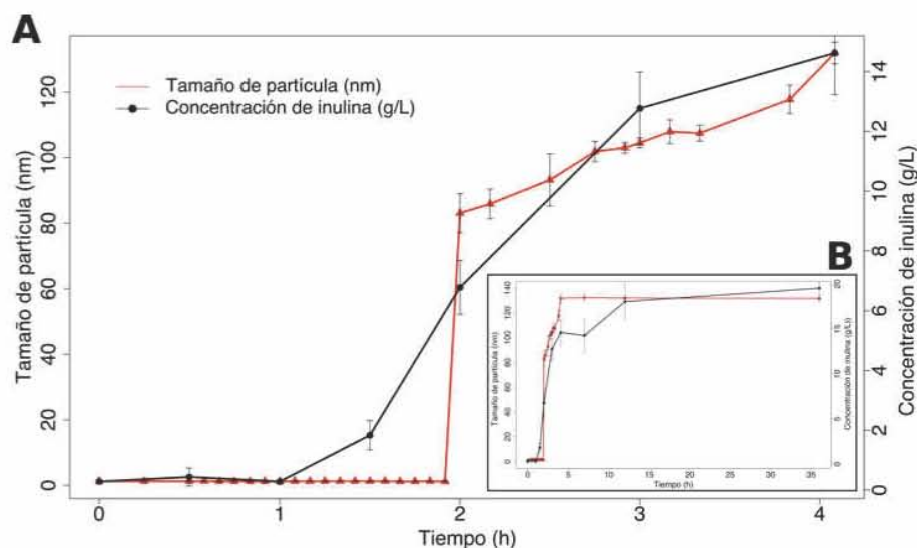


Figura 21. Comportamiento cinético de la producción de inulina empleando 0.5 U/ml de Isla4, 100 g/L sacarosa a una temperatura 4°C en solución reguladora 100 mM pH 6 (línea negra). Evolución del diámetro hidrodinámico promedio de las partículas de inulina con respecto al tiempo de reacción (línea roja). **A** Comportamiento cinético durante las primeras cuatro horas de reacción **B** Comportamiento cinético durante 36 horas de reacción.

Se tienen reportes sobre los factores que modulan la actividad transferasa e hidrolítica de la levansacarasa de *B. subtilis*, entre ellas la concentración de sacarosa, la presencia de solventes orgánicos y la temperatura. En general, la baja temperatura promueve su actividad transferasa, mientras que a altas temperaturas se favorece la hidrólisis (Tanaka, Oi, & Yamamoto, 1980; Chambert & Gonzy-Treboul, 1976). En el caso de la inulosacarasa IslaA4, se observó que la actividad hidrolítica fue mayor al disminuir la temperatura, por lo que se sugiere que las velocidades de reacción de las actividades hidrolítica y de transferencia se ven afectadas de forma distinta a las de la levansacarasa.

En cuanto al efecto de la temperatura sobre el peso molecular de las fructanas, se ha reportado un aumento en el peso molecular de la levana sintetizada por la levansacarasa de *B. subtilis* (SacB) al disminuir la temperatura de reacción a 4° C (Porras *et al.*, 2015). Al utilizar la enzima IslaA4 a estas condiciones (temperatura de reacción a 4°C), no existe un cambio en el peso molecular (3,000 kDa) del polímero como se observa en la **figura 22**.

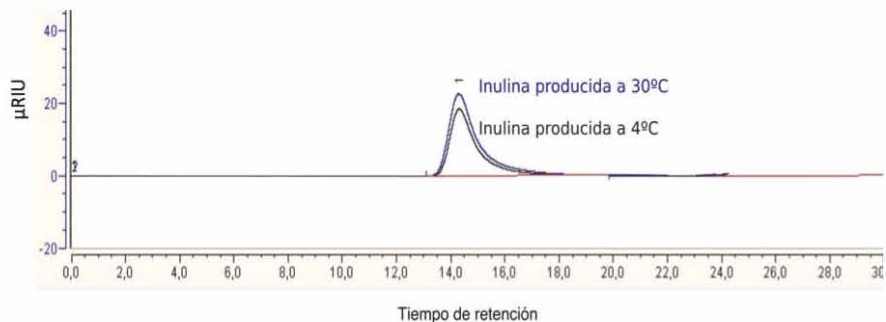


Figura 22. Cromatograma obtenido por HPLC-SEC del polímero de inulina sintetizado por IsIA4 a una temperatura de reacción de 30°C (azul) y 4°C (negro), en solución reguladora de acetatos 100mM pH6, 100 g/L de sacarosa.

9.2.4. Morfología de nanopartículas autoensambladas a 4°C

Con el objetivo de caracterizar la morfología de las nanopartículas de inulina sintetizadas enzimáticamente a 4°C, se analizaron muestras de reacción a través de microscopía electrónica de transmisión. En la **figura 22**, se pueden observar dos micrografías tomadas a muestras de reacción con un porcentaje de conversión de sacarosa de 73%. En estas micrografías se observan nanopartículas esféricas de 80 a 130 nm que concuerdan con lo registrado a través de DLS (**figura 20**) y morfológicamente similares a las observadas en reacciones a 30°C. Sin embargo, en otros campos de la misma muestra se pueden observar agregados amorfos de gran tamaño en donde se pueden visualizar cadenas de inulina con un grosor de aproximadamente 20 nm (**figura 23 A**). Estos resultados son similares a los reportados por Cooper *et al.*(2015) quienes observaron nanopartículas y cadenas de inulina de achicoria mediante microscopía electrónica de transmisión. De igual forma, Quiñonez (2015) observó cadenas similares en las muestras de levana de alto peso molecular sintetizadas por *Bacillus subtilis*.

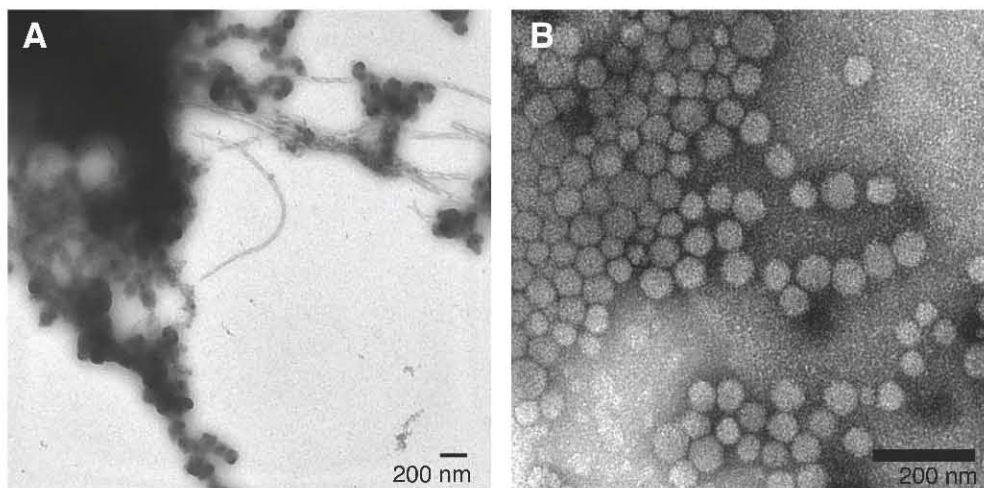


Figura 23. Micrografías utilizando TEM de nanopartículas de inulina sintetizadas enzimáticamente a 4°C empleando 0.5 U/mL IsIA4, 100 g/L sacarosa en solución reguladora de acetatos 100mM, a 73% de conversión de sustrato. A)6.3 K B) 20 K

La presencia de estos agregados amorfos, en conjunto con el incremento del tamaño promedio de las nanopartículas de inulina de *Leuconostoc citreum* sintetizado enzimáticamente a 4°C, sugieren que las condiciones de reacción no solo afectan la reacción enzimática sino también la estructuración de las nanopartículas. La temperatura pudiera estar afectando de manera directa a las moléculas de inulina al disminuir su movimiento cinético, permitiendo que dichas moléculas se acomoden de tal manera que formen hebras, posiblemente como intermediarios, favoreciendo la existencia de partículas tipo esferulitas más grandes y estables desde su nucleación tal cual lo menciona He, F. *et al.*(2007) (**figura 23A**). Este tipo de morfología esta constituida por muchas lamelas que se ramifican desde un núcleo central (Cruz Herrera, 2012), posiblemente estas lamelas se encuentren estructuradas por las hebras observadas.

Se sugiere como perspectiva de este trabajo realizar un estudio profundo que permita dilucidar el tipo de interacciones entre las moléculas que conforman las nanopartículas y cómo éstas son afectadas por la baja temperatura. Así mismo, estos resultados refuerzan la necesidad de realizar estudios sobre la caracterización morfológica utilizando microscopia electrónica de barrido, así como la elipsometría espectroscópica.

9.3. Evaluación de las propiedades biológicas de las nanopartículas de inulina sintetizadas por la inulosacarasa asociada a pared celular de *Leuconostoc citreum*.

Después de haber estudiado la formación de las nanopartículas de inulina de *Leuconostoc citreum* y haber dilucidado que son autoensambladas durante la síntesis enzimática, es de suma importancia tener un mejor entendimiento sobre las propiedades biológicas de éstas para sus futuras aplicaciones. Por lo tanto, decidimos enfocar nuestro esfuerzo en estudiar la citotoxicidad y capacidades prebióticas de estas nanopartículas, con la perspectiva de utilizarlas como posibles acarreadores de fármacos vía parenteral u oral.

9.3.1. Citotoxicidad

Una de las posibles aplicaciones de las nanopartículas de inulina es como acarreadores de fármacos suministrados vía parenteral. Una de las pruebas indispensables para el uso de un nuevo agente farmacéutico es la evaluación de toxicidad farmacéutica, que puede ser determinada por la viabilidad de las células después de estar en contacto con este agente. Al existir pocos reportes sobre la citotoxicidad de la inulina (Coussement, 1999), fue de nuestro interés corroborar la nula toxicidad de las nanopartículas de inulina sintetizada por la inulosacarasa de *Leuconostoc citreum*. Por tal motivo, decidimos realizar ensayos basados en la medición del número de células vivas después de ser expuestas a este polímero. Este análisis se llevó a cabo en colaboración con la Dra. Rebeca Pérez Morales del Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias, Universidad de Durango. En este estudio se emplearon concentraciones entre 25 y 200 µg/ml de inulina, aplicando el tratamiento de exposición a 24 horas a un cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC's). Se utilizó como control positivo de muerte celular un tratamiento de 24 horas con etanol al 96%.

Como se puede observar en la **figura 24**, existe una alta viabilidad de las células después de haber sido expuestas por 24 horas a una muestra de inulina a diferentes concentraciones. Solamente se observó que a una concentración de 150 µg/ml, existe un número de células

con una reducción significativa con respecto al control ($p=0.03$). Sin embargo, no alcanza el valor de Dosis Letal 50 (DL_{50}), parámetro donde se reduce al 50% la densidad de células (aproximadamente 3×10^4 células).

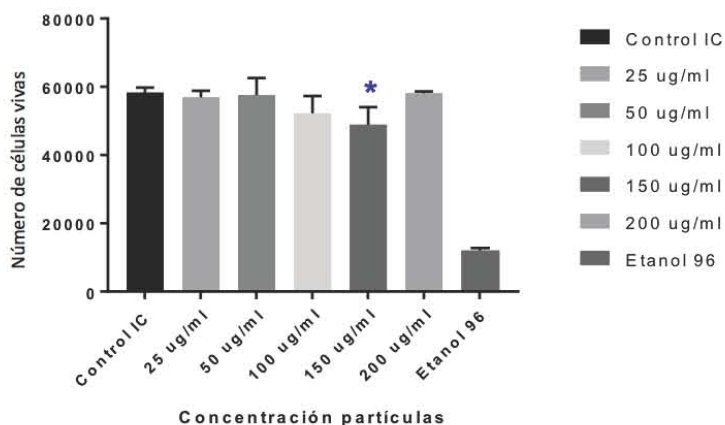


Figura 24. Análisis de la citotoxicidad de inulina de alto peso molecular de *Leuconostoc citreum* expresado en número de células vivas con respecto a diferentes concentraciones de polímero.

El control positivo con etanol al 96% muestra una mortalidad mayor al 50%. Por lo tanto se puede concluir que no existe citotoxicidad importante por la exposición a inulina sintetizada por la inulosacarasa Isla de *Leuconostoc citreum*

Estos resultados concuerdan con lo observado por Takeda y Niizato (1982), quienes a través de un estudio toxicológico utilizando FOS tipo inulina, demostraron que estos presentan nula toxicidad. Dado a las similitudes químicas que tienen la inulina bajo peso molecular, oligofruktosas y FOS con la inulina de alto peso molecular, los autores proponen que los efectos citotóxicos de éstos deberían ser nulos. En general, estos resultados fortalecen la propuesta de aplicar estas nanopartículas como nano-acarreadores de fármacos

9.3.2. Potencial prebiótico

Otra de las posibles aplicaciones de estas nanopartículas de inulina es su uso como acarreadores de fármacos sitio dirigidos al colon, donde puedan ser degradadas por la microbiota y de esta manera liberar el fármaco. Sin embargo, hasta el momento no existen reportes sobre potencial prebiótico de inulinas de alto peso molecular (Barclay, 2010). Por

tal motivo, se decidió realizar una evaluación del crecimiento de 13 diferentes cepas probióticas utilizando como única fuente de carbono a este tipo de inulina estructurada en forma de nanopartículas.

Las cepas empleadas para esta evaluación fueron: *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus LA-5*, *Lactobacillus rhamnosus GG*, *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei CRL431*, *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei*, *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei shirota*, *Bifidobacterium animalis ssp. lactis BB12*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis Sr 3.54*, *Bifidobacterium longum ssp. infantis*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lactobacillus brevis* y *Streptococcus salivarius ssp.* La fructosa y los FOS Orafiti (fructooligosacáridos tipo inulina) fueron utilizados como control positivo, mientras que cultivos sin fuente de carbono fueron empleados como control negativo.

En la **figura 25**, se muestra la densidad óptica máxima (D.O.M._{600nm}) alcanzada a las 48 horas de las 13 cepas probióticas utilizando la inulina, fructosa y FOS de Orafiti como fuente única de carbono. Al utilizar la fructosa, se observó un crecimiento similar para todas las cepas con una D.O.M._{600nm} entre 1.53 y 1.68. De la misma forma, en el caso del crecimiento empleando FOS Orafiti como fuente de carbono, se registraron valores de D.O.M._{600nm} entre 1.43 y 1.63. En contraste, los cultivos de 11 de las 13 cepas probióticas no registraron crecimiento significativo al utilizar la inulina de *Leuconostoc citreum* como única fuente de carbono. Solamente se registró un crecimiento significativo con respecto al control negativo ($p < 0.05$) de las cepas *Bifidobacterium longum ssp. infantis* y *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* BB12. A pesar de esta diferencia significativa, se observa que el crecimiento de *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* BB12 y *Bifidobacterium longum ssp. infantis* fue de únicamente el 8% y 3% con respecto al crecimiento total al utilizar fructosa. Este resultado demuestra que existe degradación por estas dos cepas sin embargo, no pudieron degradar a la inulina de alto peso molecular de manera eficiente. Este resultado fue contrario a lo esperado, ya que existen sólidos antecedentes sobre el potencial prebiótico de inulina utilizando distintas cepas (Makras *et al.*, 2005; Baston, *et al.*, 2012; Pinheiro de Souza *et al.*, 2012; Kunová, *et al.*, 2011; Rossi, *et al.*, 2005). Se debe considerar que dichos previos

estudios se realizaron con inulina de un grado de polimerización máximo de 36, siendo este un peso no comparable con la inulina utilizada en el presente trabajo (GP 18,500), lo que sugiere que el peso molecular pudiera ser el factor limitante para su hidrólisis y por consecuencia, el crecimiento de estas cepas probióticas.

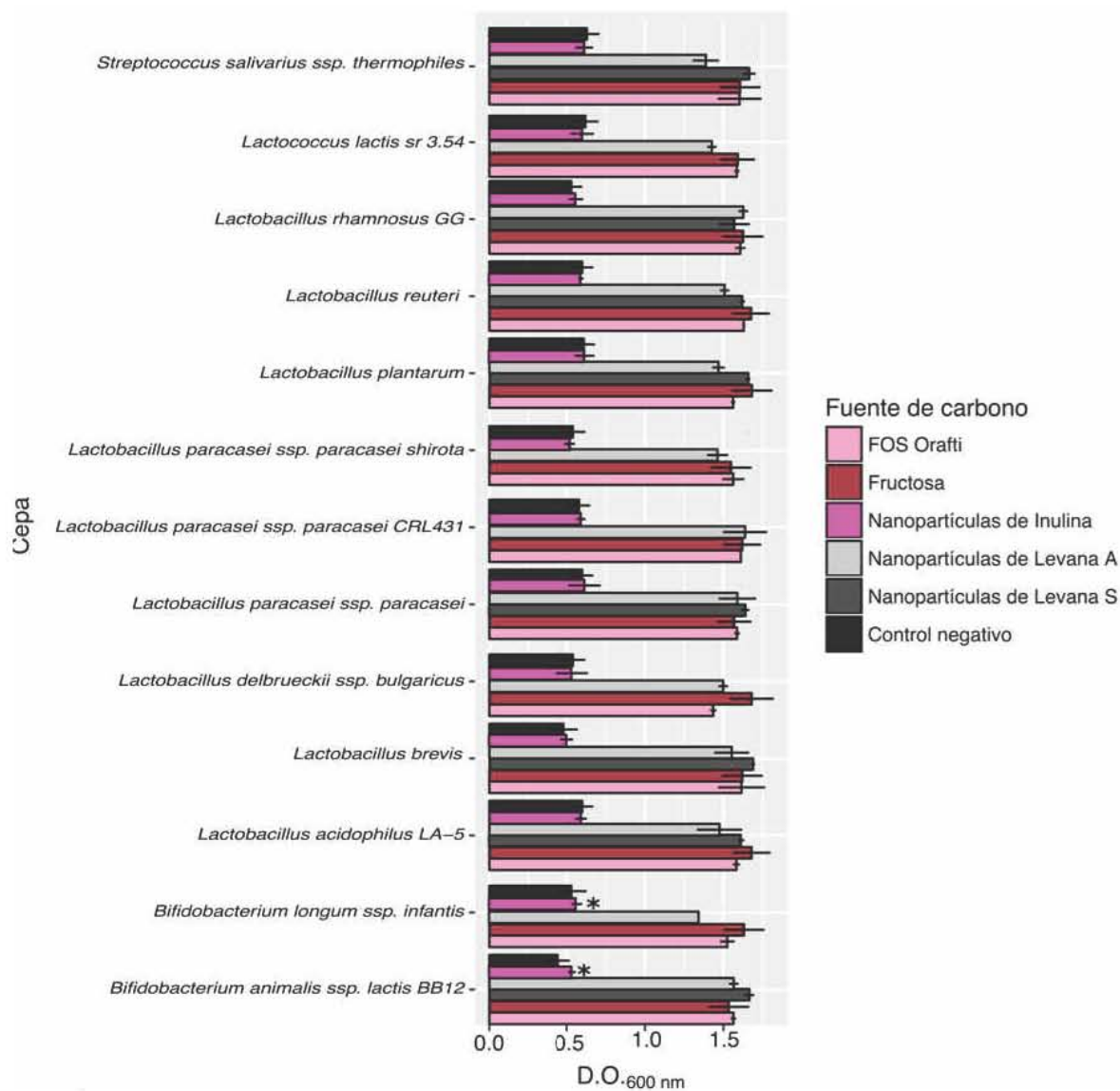


Figura 25. Densidad Óptica Máxima (D.O. M. $_{600nm}$) de cepas probióticas utilizando fructosa, FOS Orafti, NP de Inulina, NP de Levana A y NP de Levana S como única fuente de carbono. La D.O. M. $_{600nm}$ fue medida a 48 horas de incubación en medio MRS.

Debido a lo anterior, fue de nuestro interés probar si estas cepas tenían la capacidad de crecer metabolizando otras fructanas de alto peso molecular. Por lo tanto, se decidió evaluar las nanopartículas de levanas A y S (Quiñonez, 2015). La levana A, sintetizada por *Bacillus subtilis*, tiene un grado de polimerización aproximado de 19,500, un porcentaje de ramificación 11% y un peso molecular 3,500 kDa. Mientras que la levana S, sintetizada por la levansacarasa multidomino de *Leuconostoc mesenteroides*, exhibe un grado de polimerización de 13,000, porcentaje de ramificación del 17.3% y un peso molecular de 2,200 kDa. Estas levanas, si bien no tienen los enlaces β (2-1) que posee la inulina, tienen un peso molecular comparable.

En la **figura 25** se observa que todas las cepas probióticas evaluadas fueron capaces de crecer eficientemente empleando levana A y S como fuente de carbono, demostrando su potencial prebiótico. Para realizar una mejor comparación del crecimiento de estas cepas se calculó el valor ET_{50} , el cual equivale al tiempo en alcanzar la mitad de la densidad óptica máxima $_{600nm}$ con respecto a la fructosa (Müeller *et al.*, 2016), estos valores se muestran en la **tabla 4**.

Tabla 4 Valores de ET_{50} [h] calculados al evaluar el crecimiento de cepas probióticas empleando diferentes fructanas como única fuente de carbono.

Fructana	GP promedio	<i>L. reuteri</i>	<i>L. acidophilus</i> <i>LA-5</i>	<i>L. rhamnosus</i> <i>GG</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> <i>CRL431</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei shirota</i>	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> <i>BB12</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. lactis</i> sr 3.54	<i>B. longum</i> ssp. <i>infantis</i>	<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	<i>L. brevis</i>	<i>S. salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>
FOS Orafti (DP 2-8)	5	10.71	11.13	7.78	8.12	6.25	9.81	10.41	8.85	6.37	14.90	23.39	6.49	7.56
Levana S	12,777	9.96	13.16	8.18	ND	8.12	ND	12.60	8.41	ND	ND	ND	8.40	9.51
Levana A	19,444	10.92	11.62	8.07	9.58	7.21	20.45	11.23	10.05	8.80	17.22	23.06	9.11	12.66

*ND: no determinado.

Al utilizar como única fuente de carbono la levana A, la cepa *B. longum* ssp. *infantis* presentó el crecimiento más eficiente a 48 h de cultivo, exhibiendo un valor de D.O.M. $_{600nm}$ de 1.34 y un ET_{50} de 7.21 h. Por otro lado, la cepa menos eficiente en utilizar la levana A como fuente de carbono fue *L. paracasei* ssp. *paracasei* CRL431, la cual registró una D.O.M. $_{600nm}$ de 1.64 y un ET_{50} de 23 horas. En el caso de la levana S, la cepa con el

crecimiento más eficiente fue *L. rhamnosus GG* cuyo valor de D.O.M._{600nm} fue 1.57 y un ET₅₀ de 8.12, mientras que la cepa *L. brevis* fue la menos eficiente al registrar una D.O.M._{600nm} de 1.69 y un ET₅₀ de 13.16 horas. En general, estos resultados demuestran que la eficiencia de consumo de levana es específica para cada cepa y sustrato (dependiendo de su peso molecular y porcentaje de ramificación), sugiriendo una diferencia en los mecanismos de asimilación de estas fructanas por las bacterias probióticas.

Diversos autores han informado los mecanismos catabólicos empleados por cepas probióticas para la utilización de fructanas de bajo peso molecular. En ellos los principales actores son las enzimas que hidrolizan específicamente estos polímeros, denominadas b-fructofuranosidasas (EC 3.2.1.26) y endo-fructanasas. Las primeras son enzimas que hidrolizan enlaces fructosilo de los extremos no reductores de inulinas y levanas indistintamente, mientras que las endo-fructanasas producen cortes internos en la cadena de fructanas, liberando FOS como principal producto. Éstas se dividen en endo-inulinasas y endo-levanasas, según su preferencia para hidrolizar inulina o levana, respectivamente.

Considerando los resultados obtenidos y la actividad que estas enzimas exhiben, se sugiere que las b-fructofuranosidasas (capaces de degradar indistintamente inulina y levana) no son las responsables de la degradación de la levana en estos ensayos, ya que estas enzimas también hubieran sido capaces de hidrolizar la inulina. Por lo tanto, se propone que las enzimas que están participando directamente en la degradación de estos polímeros son endo-levanasas, y que las endo-inulinasas por alguna causa, no son producidas y/o activadas en estas cepas bajo estas condiciones. Se ha demostrado que la producción de endo-inulinasas puede ser inducible en algunos microorganismos, siendo los inductores fructosa, sacarosa o FOS (Rossi, *et al.*, 2005) la falta de esta inducción pudiera ser el factor responsable del nulo crecimiento de estas cepas probióticas al utilizar la inulina como única fuente de carbono.

Con el objetivo de elucidar si la fructosa o los FOS tipo inulina inducen la producción de enzimas con actividad inulinasa según lo reportado por Rossi *et al.*(2005), se estudió el crecimiento de la cepa *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 en presencia de

estos sustratos. Como se muestra en la figura 26, los cultivos empleando como única fuente de carbono a las nanopartículas de inulina, mostraron un crecimiento significativo ($p < 0.05$) al registrar una D.O.M._{600nm} de 0.64 al compararlos con cultivo sin fuente de carbono. Este resultado es similar al observado en las cepas de *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* BB12 y *Bifidobacterium longum ssp. infantis* antes analizadas (Figura 25). Por otro lado, en los análisis empleando la mezcla inulina-FOS, se observó un crecimiento significativo ($p < 0.05$) con una D.O.M._{600nm} de 2.3. Al comparar este dato con el obtenido empleando únicamente FOS (1.86 de D.O.M._{600nm}) se observa una diferencia significativa, sugiriendo que los FOS están induciendo la producción de alguna enzima con actividad inulinasa.

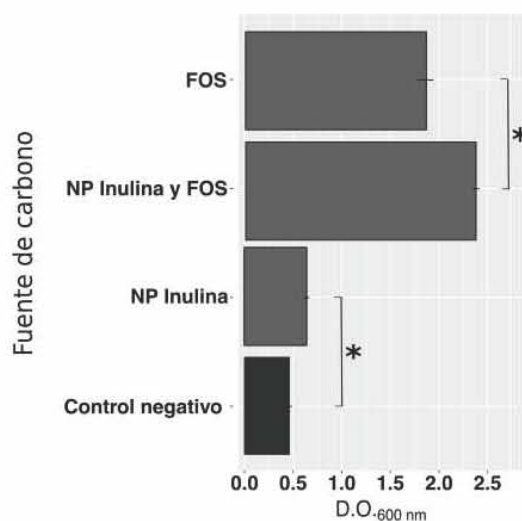


Figura 26. D.O.M. _{600nm} obtenida al utilizar como única fuente de carbono inulina, inulina-FOS y FOS.

Con la finalidad de determinar si las nanopartículas de inulina y los FOS fueron hidrolizados y consumidos, se analizó la concentración de estos sustratos al inicio y al final de la fermentación (25 h). Al utilizarse solamente las nanopartículas de inulina como fuente de carbono no se observa una disminución significativa ($p < 0.05$) (**tabla 5**).

Tabla 5 Concentración de inulina cuantificada al inicio y final de la fermentación.

Fuente de carbono	Inulina (g/L) inicio de fermentación	Inulina (g/L) 25 h de fermentación	Diferencia significativa (p<0.05)
Inulina	6.4 ± 0.3	5.8 ± 0.8	No
Inulina y FOS	28.6 ± 1.8	27.0 ± 0.11	Si

Este resultado concuerda con lo esperado: una disminución de inulina debido a la utilización de esta fuente de carbono sin embargo, esta disminución en la concentración de inulina no es congruente con el nivel de crecimiento de las cepa de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697, lo que refleja la baja eficiencia de degradación de este polímero. Los resultados presentados en esta sección demuestran que las nanopartículas de inulina sintetizada por la enzima IslA pueden llegar a ser hidrolizadas por cepas de bifidobacterias probióticas aunque con menor eficiencia que otros prebióticos. Se ha sugerido que el metabolismo de fructanas en el tracto intestinal podría ser un proceso de cooperación entre diferentes especies (sintrofismo) (Rossi *et al.*, 2005). Por lo tanto, se propone como perspectiva realizar un estudio utilizando esta inulina de *Leuconostoc citreum* y un consorcio específico de cepas probióticas, o un inóculo del microbioma del colon, para estudiar más a fondo la degradación de las nanopartículas para la liberación de un fármaco.

10. Conclusiones

Al realizar el presente estudio, se pudo obtener información sobre las características físicoquímicas, morfológicas y biológicas que la inulina producida por *Leuconostoc citreum* posee. Se determinó que este polímero tiene un porcentaje de ramificación del 10.25%, sugiriendo que existe una ramificación cada 8 fructosas. Las nanopartículas de inulina tienen un valor de potencial Z de -2.15 ± 0.17 mV en una solución reguladora de acetatos pH 6. Se cuantificaron 2.83×10^8 nanopartículas/ml, donde el mayor número de partículas (42.61×10^6 de nanopartículas/ml) tiene un diámetro hidrodinámico aproximado de 82.5nm.

Se demostró que las nanopartículas observadas mediante la técnica de dispersión dinámica de luz y observadas bajo el microscopio electrónico de transmisión tienen una distribución de tamaño de 50 nm a 300 nm, un tamaño promedio de 97 nm y una morfología esférica. Se pudo dilucidar que la formación de estas partículas se lleva a cabo durante la reacción de síntesis enzimática del polímero, concluyendo que son autoensambladas durante la reacción. Con base en estos resultados, se puede aceptar la hipótesis planteada en el presente trabajo.

Se determinó la concentración de agregación del polímero de inulina durante una reacción enzimática a 30°C, siendo este valor de 15.17 g/L. Es a esta concentración donde se observó la aparición de nanopartículas esféricas. Al estudiar los efectos de las condiciones de reacción (fuerza iónica y temperatura), se observó que la fuerza iónica no afectó el tamaño de partícula. Sin embargo, al disminuir la temperatura a 4°C se observó un aumento del tamaño promedio de la nanopartícula a 131 nm. Las micrografías de transmisión electrónica muestran, además de las nanopartículas esféricas similares a las observadas a 30 °C, una serie de estructuras diferentes: hebras y agregados amorfos de inulina. En la reacciones desarrolladas a 4 °C se determinó una concentración de agregación para la formación de nanopartículas de 6.78 g/L de inulina inferior a la observada a 30°C, indicando que no solo la concentración de inulina promueve la formación de partículas sino también la temperatura.

Con respecto a las propiedades biológicas se puede concluir que las nanopartículas de inulina no presentaron citotoxicidad en cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC's) hasta una concentración de 200 µg/ml. Este resultado abre la puerta a su posible aplicación para generar sistemas de liberación controlada vía parenteral. Por otro lado, se sugiere que las nanopartículas autoensambladas de inulina de alto peso molecular pueden ser hidrolizadas y utilizadas, con baja eficiencia, como fuente de carbono por diversas cepas de bifidobacterias, lo que permite proponer su empleo como nanoacarreadores de fármacos sitio dirigidos al colon.

11. Perspectivas

En este trabajo fue posible obtener información importante sobre la formación de las nanopartículas de inulina de alto peso molecular, así como algunas características fisicoquímicas, morfológicas y biológicas. Sin embargo, aún quedan mucho por estudiar. Tal es el caso de la cantidad de polímero que se encuentra formando estas nanopartículas y la determinación del número de nanopartículas durante la síntesis enzimática a diferentes temperaturas (30°C y 4°C) con la finalidad de estudiar más afondo esta formación de autoensamblaje.

Es esencial seguir complementando otras propiedades biológicas de estas nanopartículas tales como su citotoxicidad en células epiteliales así como determinar su capacidad inmunomoduladora y de transgénesis. También se sugiere estudiar sus efectos antitumorales e hipocolesterolémicos, con la finalidad de identificar las posibles aplicaciones de las mismas.

Finalmente, es imperante realizar estudios de encapsulación de biomoléculas de interés durante la síntesis enzimática de estas nanopartículas, así como estudios de protección y liberación controlada de dichas biomoléculas.

Apéndice I

Medio Luria Bertani (LB). Triptona 10 g/L, Extracto de levadura 5 g/L y cloruro de sodio 10 g/L a pH 7.5.

Amortiguador TAE 1X. 40 mM de Tris base, 20 mM de ácido acético y 1 mM de EDTA a pH 8.

Amortiguador de carga para proteínas. 0.125 M de tris-Cl pH 6.8, SDS 4%, glicerol 10% y azul de bromofenol 0.25%.

Gel SDS-PAGE concentrador. Acrilamida 4.86%, Bis-acrilamida 0.13%, 0.125 M de tris básico (pH 6.8), SDS 0.1%, persulfato de amonio 0.1% y N,N,N',N'-tetrametildiamina (TEMED) 0.001% v/v.

Gel SDS-PAGE separador. Acrilamida 9.73%, Bis-acrilamida 0.26%, 0.375 M de tris básico (pH 8.8), SDS 0.1%, persulfato de amonio 0.1% y N,N,N',N'-tetrametildiamina (TEMED) 0.004% v/v.

Amortiguador PBS 10X. 1.37 mM de cloruro de sodio, 27 mM de cloruro de potasio, 100 mM de fosfato de sodio y 18 mM de fosfato de potasio.

Reactivo DNS. 1 M de tartrato de sodio y potasio, 0.4 M de hidróxido de sodio y 43 Mm de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

Referencias bibliográficas

Clevenger, M. A., & Turnbull, D. (1988). Toxicological evaluation of Neosugar: Genotoxicity, carcinogenicity, and chronic toxicity. *J. Am. Col. Toxicol.*, 28 (5), 583-9.

Lalatsa, A., & Barbu, E. (2016). Nanotechnology and the brain. In *Carbohydrate nanoparticles for brain delivery*. Elsevier.

Chambert, R., & Gonzy-Treboul, G. (1976). Levansucrase of *Bacillus subtilis*: Kinetic and thermodynamic aspects of transfructosylation processes. *European Journal of Biochemistry*, 62 (1), 55-64.

Carneiro-da-Cunha, M. G., Cerqueira, M. A., & António A. Vicent, J. A. (2011). Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multilayered films production. *Carbohydrate Polymers*, 85 (3), 522-528.

Causey, J., Feirtag, J., Gallaher, D., & Tunland, B. a. (2000). Effects of dietary inulin on serum lipids, blood glucose and the gastrointestinal environment in hypercholesterolemic men. *Nutrition Research*, 20 (2), 191-201.

Layton, R. C., & Petrovsky, N. (2011). Delta inulin polysaccharide adjuvant enhances the ability of split-virion H5N1 vaccine to protect against lethal challenge in ferrets. *Vaccine*, 29 (37), 6242-6251.

Li, R., Jianga, Z., Chen, F., Yang, H., & Guan, Y. (2004). Hydrogen bonded structure of water and aqueous solutions of sodium halides: A Raman spectroscopic study. *707* (1-3), 83-88.

Lindsay, S. (2009). *Introduction to Nanoscience*. Oxford.

Cooper, P., & Petrovsky, N. (2011). Delta inulin: A novel, immunologically active, stable packing structure comprising -D-[2 → 1] poly(fructo-furanosyl) -D-glucose polymers. *Glycobiology*, 22, 595-606.

Cooper, P., Barclay, T., Ginic-Markovic, M., & Petrovsky, N. (2013). The polysaccharide inulin is characterised by an extensive series of periodic isoforms with varying biological actions. *Glycobiology*, 23 (10), 1164-1174.

Cooper, P., Rajapaksha, K., Barclay, T., Ginic-Markovic, M., Gerson, A. R., & Petrovsky, N. (2015). Inulin crystal initiation via a glucose-fructose cross-link of adjacent polymer chains: Atomic force microscopy and static molecular modelling. *Carbohydrate Polymers*, 117, 964-972.

Coussement, P. (1999). Inulin and Oligofructose: Safe Intakes and Legal Status. *The Journal of nutrition*, 129, 1412S-1417s.

Coxam, V. (2007). Current Data with Inulin-Type Fructans and Calcium, Targeting Bone Health in Adults. *The Journal of Nutrition*, 137, 2527S-2533S.

Cruz Herrera, L. (2012). Caracterización de nanocompuestos de polietileno - co - octadeceno con tio₂, preparados mediante polimerización in - situ. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología .

Cuadros-Moreno, A., & Casañas-Pimentel, R. (2014). Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. *8* (4), 4314-1 4315-5.

Ávila-Fernández, A., Cuevas-Juárez, E., Rodríguez-Alegria, M., & López-Munguía, A. (2016). Functional characterization of a novel B-fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* spp. *infantis* ATCC15697 on structurally diverse fructans. *Journal of applied Microbiology*, 121 (1), 263-76.

Albella Martín, J. M. (2003). *Láminas delgadas y recubrimientos: preparación, propiedades y aplicaciones*. Madrid: CSIC.

Andre, I. M., & K., T. (1996). Molecular and crystal structures of inulin from electron diffraction data. *Macromolecules*, 29 (13), 4626-4635. .

Blecker, C., & al, e. (2001). Inulin: Its Physicochemical Properties and Technological Functionality. *Recent Res Devel Agricultural & Food Chem*, 5, 125-131.

Blecker, C., & Fournies, C. (2002). Kinetic study of the acid hydrolysis of various oligofructose samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (6), 1602-1607.

Barclay, T., Ginic-Markovic, M., & Cooper, P. (2010). Inulin - a versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses. *Journal of Excipients and Food Chemicals*, 1, 27-50.

Baston, O., Neagu Bonciu, C., & Bahrim, G. (2012). Preliminary study of lactic acid production from inulin hydrolysates using *Lactobacillus acidophilus* LA-5. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, , 16, 79-85.

Beylot, M. (2005). Effects of inuline-type fructans on lipid metabolism in man and in animal models. *1* (93), S163-S168.

Boer, L., & Dijkhuizen, L. (1990). Microbial and Enzymatic Processes for L-Phenylalanine Production. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology* , 41, 1-27.

Bowman, K., & Leong, K. W. (2006). Chitosan nanoparticles for oral drug and gene delivery. *International Journal of Nanomedicine* , 1 (2), 117-128.

Davidson, M., Maki, K. S., & Drennan, K. (1998). Effects of dietary inulin on serum lipids in men and women with hypercholesterolemia. *Nutr. Res.* , 18 (3), 503-517.

del Moral, S., Olvera, C., & Lopez Munguia, A. (2008). Functional role of the additional domains in inulosucrase (IsIA) from *Leuconostoc citreum* CW28. *BMC Biochem* , 9 (6), 1-10.

Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid Colorimetric Assay For Cell-Growth And Survival - Modifications To The Tetrazolium Dye Procedure Giving Improved Sensitivity And Reliability. *J Immunol Methods* . , 2, 271-7.

Díez-Municio, M., de las Rivas, B., Jimeno, M., Muñoz, R., & Moreno, J. (2013). Enzymatic Synthesis and Characterization of Fructooligosaccharides and Novel Maltosylfructosides by Inulosucrase from *Lactobacillus gasseri* DSM 20604. 79, 129-4140.

Ebisu, S., & Misaki, A. (1975). Structural differences in fructans elaborated by streptococcus mutans and strep. salivarius. *Journal of Biochemistry* , 78 (5), 879-87.

Estelrich, H. J., & Pons, M. (1991). La espectroscopía de correlación fotónica y sus aplicaciones. *Industria farmacéutica: Equipos, procesos y tecnología* 4 , 4, 81 - 86.

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

Fooks, L. J., & Gibson, G. (2002). Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition* , 1, s39-s49.

Ford, R., Jakeman, E., & Oliver, C. J. (1970). Determination of diffusion coefficients of haemocyanin at low concentration by intensity fluctuation spectroscopy of scattered laser light. *Nature* , 227, 242 - 245.

Gibson, G. R. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews* , 17 (2), 259-275.

Goh, Y., Lee, J., & Hutkins, R. (2007). Functional analysis of fructooligosaccharide utilization operon in *Lactobacillus paracasei* 1195. *Appl. Environ. Microbiol* , 73 (18), 5716-24.

Govinden, L. (1985). *Introducción a la Estadística*. Bogotá, Colombia: McGraw Hill. Interamericana Editores. S.A.

Handa, C., Goomer, S., & Siddhu, A. (2012). Physicochemical properties and sensory evaluation of fructooligosaccharide enriched cookies. *Food Sci Technol* . , 49 (2), 192 – 199.

Heath, F. H. (2007). Varying polymer architecture to deliver drugs. *The AAPS Journal* , 9 (2), E235-E240.

Hébette, C. L., Delcour, J. A., Koch, M. H., Booten, K., & Kleppinger. (1998). Complex melting of semi-crystalline chicory (*Cichorium intybus* L.) root inulin. *Carbohydrate Research* , 310, 65-75.

Hijum, S., & Geel-Schutten, G.(2002). Characterization of a novel fructosyltransferase from lactobacillus reuteri that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides. *Applied and Environmental Microbiology* , 68 (9), 4390-4398.

Hinrichs, W. , Prinsen, M., & Frijlink, H. (2001). Inulin glasses for the stabilization of therapeutic proteins. *International Journal of Pharmaceutics*, 215 (1-2), 163-174.

Imran, S., & Gillis, R. B. (2012). Application and use of inulin as a tool for therapeutic drug delivery. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 28, 28-33.

Kaplan, H., & Hutkins, R. (2000). Fermentation of Fructooligosaccharides by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *Applied and environmental microbiology*, 66 (6), 2682–2684.

Kaszuba, M., McKnight, D., & Connah, M. (2008). Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering. *J Nanopart Res* , 10 (5), 823–829.

Kitamura, S., Hirano, T., & Takeo, K. (1994). Conformation of (2 -<l)-beta -D-fructan in aqueous solution. *Int. J Biol. Macromol* , 16 (6), 313-7.

Kobayashi, H., Tan, M., & Fleming, S. (2003). Sodium butyrate inhibits cell growth and stimulates p21 wap/CIP1 protein in human colonic adenocarcinoma cells independently of p53 status. *Nutr Cancer* , 46 (2), 202 – 211.

Komissarova, E., Saha, S., & Rossman, T. (2005). Dead or dying: the importance of time in cytotoxicity assays using arsenite as an example. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 202 (1), 99–107.

Korbelik, M., & Cooper, P. (2007). Potentiation of Photodynamic Therapy of Cancer by Complement: The Effect of Gamma-Inulin. *British Journal Of Cancer*, , 96 (1), 67-72.

Kumar, R., Manjunatha, S., & Kathiravan, T. (2015). Rheological characteristics of inulin solution at low concentrations: Effect of temperature and solid content. *J Food Sci Technol*, 52 (9), 5611–5620.

Kunová, G., Rada, V., & Lisová, I. (2011). In vitro Fermentability of Prebiotic Oligosaccharides by *Lactobacilli*. *Czech J. Food Sci.*, 29, 49-54.

Malvern. (2009). Zetasizer Nano User Manual. Reino Unido: Malvern Instruments Ltd.

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

Makras, L., Van Acker, G., & De Vuyst, L. (2005). *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2 Degrades Inulin-Type Fructans Exhibiting Different Degrees of Polymerization. *Applied and environmental microbiology*, 71 (11), 6531–6537.

Maris, B., Verheyden, L., Van Reeth, K., & Samyn, C. (2001). Synthesis and characterisation of inulin-azo hydrogels designed for colon targeting. *International Journal of Pharmaceutics*, 213 (1-2), 143–152.

Méndez-Lorenzo, L., & López Munguía, A. (2015). Intrinsic Levansucrase Activity of *Bacillus subtilis* 168 Levansucrase (SacB). *Plos One*, 10 (11), 1-15.

Meyer, D., Bayarri, S., & Tárrega, A. (2011). Inulin as texture modifier in dairy products. *Food Hydrocolloids*, 25 (8), 1811-1890.

Mohammad, M. & Mutaz, S. (2015). Dissolution enhancement of curcumin via curcumin–prebiotic inulin nanoparticles. *Drug Development and Industrial pharmacy*, 41 (11), 1520-5762.

Morales-Arrieta, S., Rodríguez, M., Segovia, L., López-Munguía, A., & Olvera-Carranza, C. (2006). Identification and functional characterization of levS, a gene encoding for a levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F. 376 (1), 59–67.

Mora-Huertas, C., Fessi, H., & Elaissari, A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 385 (1-2), 113-142.

Moshfegh, A., Friday, J., & Goldman, J. (1999). Presence of Inulin and Oligofructose in the Diets of Americans . *129*, 1407S-1411s.

Moulik, S., Dan, A., & Ghosh, S. (2009). Physicochemical Studies on the Biopolymer Inulin: A Critical Physicochemical Studies on the Biopolymer Inulin: A Critical Evaluation of Its Self-Aggregation, Aggregate-Morphology, Evaluation of Its Self-Aggregation, Aggregate-Morphology, Interaction with Water, and Thermal Stability. *Wiley InterScience* , *91* (9), 687-691.

Mueller, M., Reiner, J., Fleischhacker, L., Loeppert, R., & Praznik, W. (2016). Growth of selected probiotic strains with fructans from different sources relating to degree of polymerization and structure. *Journal of functional foods* , *24*, 264-275.

Nakapong, S., & Pichyangkura, R. (2013). High expression level of levansucrase from *Bacillus licheniformis* RN-01 and synthesis of levan nanoparticles. *Int J Biol Macromol* , *54*, 30-36.

Olivares-Illana, V., & López-Munguía, A. (2002). Characterization of a cell-associated inulosucrase from a novel source: A leuconostoc citreum strain isolated from pozol, a fermented corn beverage of mayan origin. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* , *28* (2), 112-117.

Olvera, C., & López-Munguía, A. (2007). Structural and functional features of fructansucrases present in leuconostoc mesenteroides. *Antonie Van Leeuwenhoek* , *92* (1), 11-20.

Ortiz Soto, M. E., Olivares-Illana, V., & López-Munguía, A. (2004). Biochemical properties of inulosucrase from *Leuconostoc citreum* CW28 used for inulin synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation* , *22* (4), 275-281.

Peña-Cardena, A., Rodriguez-Alegria, M. E., Olvera, C., & López-Munguia, A. (2015). Synthesis of Fructooligosaccharides by Isla4, a truncated inulosucrase from *Leuconostoc citreum*. *BMC Biotechnology* , *15*, 1-9.

Phillips, G., & Williams, P. (2000). Chapter 20: Gums for coatings and adhesives. In *Handbook of Hydrocolloids*. Sawston, UK.: Woodhead Publishing Limited,.

Pinheiro de Souza Oliveira, R., & Perego, P. (2012). Effect of inulin on the growth and metabolism of a probiotic strain of *Lactobacillus rhamnosus* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. *Food Science and Technology* , *47* (2), 358–363.

Pitarresi, G., & Mandracchia, D. (2011). New biodegradable hydrogels based on inulin and α,β -polyaspartylhydrazide designed for colonic drug delivery: In vitro release of glutathione and oxytocin. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* , *22*, 313-328.

Podzimek, S. (2011). *Light Scattering, Size Exclusion Chromatography and Asymmetric Flow Field Flow Fractionation : Powerful Tools for the Characterization of Polymers, Proteins and Nanoparticles*. Canadá: Wiley.

Porras-Dominguez, J. (2012). Obtención de fructooligosacáridos a partir de levanas bacterianas mediante el uso de endolevanasas. *Tesis de Maestría. Institut de Biotecnología. Universidad Autónoma de México .*

Porras-Domínguez, J. R., Ávila-Fernández, Á., & López Munguía, A. (2015). *Bacillus subtilis* 168 levansucrase (SacB) activity affects average levan molecular weight. *Carbohydrate Polymers* , 135 (5), 338–344.

Quiñonez, O. (2015). Tesis de Licenciatura: Caracterización de nanopartículas de fructanas de diversos orígenes.

Raga-Carbajal, E. (en progreso). *Bases moleculares del mecanismo de elongación de levanas de SacB de Bacillus subtilis*. Instituto de Biotecnología, UNAM. México: Tesis doctoral.

Ritsema, T., & Smeeckens, S. (2003). Fructans: Beneficial for plants and humans. . *Current Opinion in Plant Biology* , 6, 223-230.

Roberfroid, M. (1999). Caloric value of inulin and oligofructose. *Journal Nutrition* , 129 (7), 1436-1437.

Roberfroid, M., & Slavin, J. (2000). Nondigestibles oligosaccharides. *Critical Reviews Food Science Nutritiona* , 68 (3), 587–597.

Rossi, M., Corradini, C., & Amaretti, A. (2005). Fermentation of Fructooligosaccharides and Inulin by Bifidobacteria: a Comparative Study of Pure and Fecal Cultures. *Applied and environmental microbiology* , 71 (10), 150-8.

Santiago-Rodríguez (2013). Synthesis, stability, cellular uptake, and blood circulation time of carboxymethyl-inulin coated magnetic nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry. B, Materials for Biology and Medicine* , 1 (22), 2807-2817.

Saulnier, D., & de Vos, W. (2007). Identification of prebiotic fructooligosaccharide metabolism in *Lactobacillus plantarum* WCFS1 through microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* , 73 (6), 1753-65.

Sezer, A. D., & Kazak, H. (2011). Levan-based nanocarrier system for peptide and protein drug delivery: Optimization and influence of experimental parameters on the nanoparticle characteristics. *Carbohydrate Polymers*, *84* (1), 358-363.

Sharma, N., Madan, P., & Lin, S. (2016). Effect of process and formulation variables on the preparation of parenteral paclitaxel-loaded biodegradable polymeric nanoparticles: A co-surfactant stud. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *11* (3), 404-416.

Silva, D. G., Cooper, P. D., & Petrovsky, N. (2004). Inulin-derived adjuvants efficiently promote both th1 and th2 immune responses. . *Immunology and Cell Biology*, *82* (6), 611-616.

Silva, D., Cooper, P., & Petrovsky, N. (2004). Inulin- Derived Adjuvants Efficiently Promote Both Th1 and Th2 Immune Responses. . *Immunology and Cell Biology*, 611-616.

Stephen, A., Phillips, G., & Williams, P. (2006). *Food Polysaccharides and their applications*. Taylor & Francis Group.

Stryer, L., Berg, J., & Tymoczko, J. (2012). *Biochemistry*. Basingstoke : W.H. Freeman.

Sundar, S., Kundu, J., & Kundu, S. (2010). Biopolymeric nanoparticles Sushmitha. *Science and technology of advance materials*, *11* (1), 1-13.

Takagi, R., & Tsujikawa, Y. (2014). Comparison of the Growth of *Lactobacillus delbrueckii*, *L. paracasei* and *L. plantarum* on Inulin in Co-culture Systems. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, *33* (4), 139-146.

Takeda, U., & Niizato, T. (1982). Acute and subacute safety tests. Presented at the Proceedings of the 1st Neosugar Research Conference.

Tanaka, T., Oi, S., & Yamamoto, T. (1980). The molecular structure of low and high molecular weight synthesized by levansucrase. *Journal of Biochemistry*, *87* (1), 297-303.

Tripodo, G., & Pasut, G. (2015). Inulin-d- α -Tocopherol Succinate (INVITE) Nanomicelles as a Platform for Effective Intravenous Administration of Curcumin. *Biomacromolecules*, *16* (2), 550-557.

Vallejo García, L. C. (2017). *Producción de fructooligosacáridos a partir de sacarosa mediante procesos enzimáticos novedosos*. Instituto de Biotecnología.

Van den Mooter, G., Vervoort, L., & Kinget, R. (2003). Characterization of methacrylated inulin hydrogels designed for colon targeting: In vitro release of BSA. *Pharmaceutical Research*, 20 (2), 303–307.

Vera Lopez-Portillo, F. (2015). *Identificación de residuos o regiones involucrados en la especificidad del producto de las fructosiltransferasas*. Instituto de Biotecnología, Cuernavaca.

Vervoort, L. (1997). Inulin Hydrogels as Carriers for Colonic Drug Targeting: I. Synthesis and Characterization of Methacrylated Inulin and Hydrogel Formation. *Pharmaceutical Research*, 14 (12), 730-1737.

Wada, T., Sugatani, J., & Terada, E. (2005). Physicochemical Characterization and Biological Effects of Inulin Enzymatically Synthesized from Sucrose. *J. Agric. Food Chem*, 53 (4), 1246–1253.

Wolff, D., Czapla, S., & Heyer, A. (2000). Globular shape of high molar mass inulin revealed by static light scattering and viscometry. *Polymer*, 41 (22), 8009- 8016.

Wongsagonsup, R., Shobsngob, S., & Oonkhanond, B. (2005). Zeta potential and pasting properties of phosphorylated or crosslinked rice starches. *Starch*, 57 (1), 32-37.

Wyllie, A., Kerr, J., Currie (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol*, 1, 251–306.

Zhang, L., & Li, Y. (2014). Synthesis of methylprednisolone loaded ibuprofen modified inulin based nanoparticles and their application for drug delivery. *Materials Science and Engineering C*, 42, 111-115.

Zimeri, J., & Kokini, J. (2002). The effect of moisture content on the crystallinity and glass transition temperature of inulin. *Carbohydrate Polymers*, 48 (3), 299–304.

He, F., & Zhao, D. (2007). Manipulating the size and dispersibility of zerovalent iron nanoparticles by use of carboxymethyl cellulose stabilizers. *Environmental Science & Technology*, 41(17), 6216-6221. doi:10.1021/es0705543