



METABOLISMO DE LOS
FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS EN LA
MADURACIÓN DE LAS RAÍCES DE
YACÓN [*Smallanthus sonchifolius* (Poeppig &
Endlicher) H. Robinson]. UN ENFOQUE
MULTIDISCIPLINARIO.

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTORA
EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

PATRICIA ANGELICA MORENO DIAZ DE
SACO

LIMA – PERÚ

2026

ASESORA

DRA. ROSANA SONIA CHIRINOS GALLARDO

CO-ASESORA

DRA. ROSA PATRICIA HERRERA VELIT

JURADO DE TESIS

DR. WILFREDO ANTONIO GONZALES LOZADA

PRESIDENTE

DRA. ANA AKEMI KITAZONO SUGAHARA

VOCAL

DR. LUIS JULIO CESAR DE STEFANO BELTRAN

SECRETARIO

DEDICATORIA.

A mi familia, la fuerza de mi ser y en
especial a mi madre!

AGRADECIMIENTOS.

A mi asesora la Dra. Rosana Chirinos Gallardo por su acompañamiento y respaldo
en la última etapa de esta tesis.

Al Dr. David Campos Gutierrez por brindarme su experiencia, el espacio de
trabajo y las facilidades para desarrollar la primera parte de este trabajo.

A la Dra. Patricia Herrera Velit Co-asesora por su continuo respaldo.

A Rosalyn Vega, Patricia Cuba y Hiromi Uchima por la ayuda prestada en el
trabajo experimental.

Al Mg. Roger Torres Aliaga por sus enseñanzas y alcances para el manejo de las
herramientas moleculares en las plantas de yacón.

A la Mg. Lucero Huasasquiche por su amistad y la ayuda en la revisión y
corrección del borrador final.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

"Variación estacional de la actividad fructano exohidrolasa y del contenido de fructooligosacáridos (FOS) en 3 cultivares de yacon (*Smallanthus sonchifolius*)"

Contrato N°195-2005 CONCYEC-OAJ. Investigadora Principal.



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Los egresados:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES
1.	MORENO DIAZ DE SACO PATRICIA ANGELICA

Pertenecientes al programa de la **DOCTORADO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**, autores del trabajo titulado: **METABOLISMO DE LOS FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS EN LA MADURACIÓN DE LAS RAÍCES DE YACÓN** [*Smallanthus sonchifolius* (Poeppig & Endlicher) H. Robinson]. **UN ENFOQUE MULTIDISCIPLINARIO.**, el cual ha sido elaborado, sustentado y aprobado, según corresponda, para optar por el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR** bajo la modalidad de **TESIS**.

En calidad de docentes asesores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES DEL DOCENTE	FACULTAD	NIVEL DE ASESORÍA
1.	CHIRINOS GALLARDO ROSANA SONIA	FACI	ASESOR
2.	HERRERA VELIT ROSA PATRICIA	FACI	CO ASESOR

Declaramos que el contenido del presente documento es original y que las citas y referencias a otros autores cumplen con las normas académicas establecidas. En ese sentido, hacemos constar que:

- El documento presenta un porcentaje de similitud de **12%**, según el reporte emitido por el software **Turnitin®** (identificador de entrega: **3011614881**; fecha de entrega: **12-08-2026**).
- Tras una revisión detallada del reporte y del contenido del trabajo en cuestión, no se han identificado indicios de plagio.
- Se certifica que el documento respeta los principios de integridad académica y cumple con los requisitos institucionales de originalidad.

Lugar y fecha: **Lima, 12 de agosto de 2026**

Firma del asesor
N° DNI: 09489616
ORCID: 0000-0002-9045-7471

Firma del Co-asesor
N° DNI: 08266444
ORCID: 0000-0001-8754-9335

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo General.....	3
2.2. Objetivos Específicos	4

Capítulo 1. Variación estacional del contenido de FOS y de la actividad de las enzimas involucradas en accesiones seleccionadas de yacón..5

1. RESUMEN.....	6
2. OBJETIVOS.....	7
2.1. Objetivo general.....	7
2.2. Objetivos específicos	7
3. MARCO TEÓRICO	7
3.1. Taxonomía y descripción morfológica del yacón	7
3.2. Distribución geográfica y producción.....	9
3.3. Beneficios del yacón	9
3.4. Cosecha y manejo postcosecha del yacón	10
3.5. Composición química del yacón.....	11
3.6. Metabolismo de los fructanos	12
3.7. Importancia de los fructooligosacáridos (FOS)	14
4. METODOLOGÍA	15
4.1. Material vegetal	15
4.2. Instalación del campo experimental	15
4.3. Etapa I: Análisis físico-químicos del material vegetal.....	18
4.4. Etapa II: Determinación de la actividad enzimática	21
4.5. Diseño experimental y Análisis estadístico	24
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	25
5.1. Evaluación de las características físicas en las raíces de yacón	25
5.2. Evaluación de las características químicas en raíces	32

5.3.	Evaluación del contenido de fructosa, glucosa, sacarosa y FOS	34
5.4.	Correlación entre azúcares libres, materia seca, sólidos solubles y FOS 41	
5.5.	Evaluación del grado de polimerización promedio	47
5.6.	Evaluación de actividad enzimática FEH, FFT, SST e invertasa	49
6.	CONCLUSIONES.....	59

Capítulo 2. Caracterización bioquímica y purificación de la fructano exohidrolasa (FEH) de yacón.60

1.	RESUMEN.....	61
2.	OBJETIVOS.....	62
2.1.	Objetivo general.....	62
2.2.	Objetivos específicos	62
3.	MARCO TEÓRICO	62
3.1.	La enzima fructano exohidrolasa (FEH) y la movilización de fructanos 63	
3.2.	Regulación de la actividad 1-FEH en plantas productoras de fructanos 65	
3.3.	Purificación de la FEH.....	67
4.	METODOLOGÍA	70
4.1.	Material vegetal	70
4.2.	Extracción enzimática.....	70
4.3.	Evaluación de la actividad enzimática.....	71
4.4.	Determinación de contenido de proteína	71
4.5.	Purificación de la FEH.....	71
5.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	75
5.1.	Actividad enzimática de la FEH durante un periodo de crecimiento del yacón	75
5.2.	Caracterización de la FEH en extracto crudo	78
5.3.	Concentración del extracto crudo	80
5.4.	Precipitación Proteica	82
5.5.	Cromatografías de Purificación	83
5.6.	Electroforesis	94

5.7. Especificidad de la fructano exohidrolasa parcialmente purificada sobre diferentes sustratos	97
6. CONCLUSIONES.....	101
 Capítulo 3. Caracterización molecular de la FEH de yacón a partir de la obtención del ADNc de las raíces reservantes.....	
1. RESUMEN.....	104
2. OBJETIVOS.....	104
2.1. Objetivo general.....	105
2.2. Objetivos específicos	105
3. MARCO TEÓRICO	105
3.1. Aproximaciones en la extracción y purificación del RNA total	105
3.2. Estudios previos de obtención de FEHs	107
3.3. Técnicas moleculares para la obtención de FEHs	109
3.4. Modelamiento de las FEH	110
4. METODOLOGÍA	113
4.1. Obtención del ARN total.....	113
4.2. Obtención de la secuencia de nucleótidos del ADNc de la FEH de yacón	117
4.3. Obtención de las regiones no codificantes del ADNc de la FEH de yacón.....	119
4.4. Preparación de clones para su secuenciamiento	121
4.5. Análisis filogenético de la FEH de yacón.....	126
4.6. Modelamiento de la enzima 1-FEH de yacón.....	127
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	128
5.1. Desarrollo del protocolo de extracción del ARN total a partir de raíces de yacón.....	128
5.2. Obtención del ADNc de la FEH de yacón	130
5.3. Modelamiento por homología estructural.....	137
6. CONCLUSIONES.....	145
CONCLUSIONES GENERALES	146
 RECOMENDACIONES	
GENERALES.....	147
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	148

ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPITULO 1.

Figura 1.1. Plano de siembra en el campo experimental	16
Figura 1.2. Campo experimental de yacón a los seis meses de crecimiento.....	17
Figura 1.3. Flujograma de trabajo para la determinación de propiedades físicas y químicas en las raíces de yacón	18
Figura 1.4. Flujograma de trabajo para la determinación de la actividad enzimática en las raíces de yacón.....	23
Figura 1.5. Color de pulpa y cáscara de las cinco accesiones de yacón a los doce meses de crecimiento.	26
Figura 1.6. Distribución porcentual de peso fresco de raíces (gramos) en las cinco accesiones a los siete meses de crecimiento.	29
Figura 1.7. Variación de fructosa, glucosa, sacarosa y FOS (% b.s) de cinco accesiones de yacón desde los seis hasta los doce meses de crecimiento.....	42
Figura 1.8. Correlación lineal entre el contenido de FOS y fructosa (A), glucosa (B) y sacarosa (C). Análisis de regresión múltiple (D). Modelo Lineal Generalizado para la relación FOS :azúcares fructosa, glucosa y sacarosa (E).	44
Figura 1.9. Variación de materia seca (%), sólidos solubles (°Brix) y FOS (% base seca) de cinco accesiones de yacón desde los seis hasta los doce meses de crecimiento.....	46
Figura 1.10. Correlación entre el contenido de materia seca (A), sólidos solubles (B) y FOS.	47
Figura 1.11. Cromatograma de la actividad FEH sobre inulina para la accesión ACW 5076 a los ocho meses de crecimiento.....	50
Figura 1.12. Cromatograma de la actividad FEH sobre kestosa para la accesión DPA 07011 a los diez meses de crecimiento.....	50

Figura 1.13. Cromatograma de la actividad FFT sobre kestosa para la accesión ACW 5076 a los siete meses de crecimiento.	51
Figura 1.14. Actividad enzimática de fructano exohidrolasa (FEH) sobre sustrato inulina y kestosa evaluada en tres accesiones de yacón desde el sexto hasta los doce meses de crecimiento. * Significancia según Test ANOVA ($\alpha = 0.05$). n.s. no hay significancia	52
Figura 1.15. Actividad enzimática de FFT, SST e invertasa evaluada en tres accesiones de yacón desde los seis hasta los doce meses de crecimiento.....	53

CAPITULO 2.

Figura 2.1. Actividad específica (U/mg) de la FEH en raíces de yacón de la accesión AMM 5163 analizado por HPLC con sustrato kestosa.	76
Figura 2.2. Actividad específica (U/mg) FEH utilizando Inulina como sustrato en método colorimétrico.	77
Figura 2.3. Caracterización de la FEH en extracto crudo (A) Actividad específica en el rango de pH 3.5 – 7.5 sobre sustrato inulina y kestosa (B) Actividad específica en el rango de 10 °C – 60 °C sobre sustrato inulina (C) Actividad específica a diferentes concentraciones de sustrato inulina (1 – 10 %).....	79
Figura 2.4. Cromatografía de Afinidad (ConA).....	84
Figura 2.5. Cromatografía de Intercambio aniónico con las fracciones obtenidas de la Cromatografía de Afinidad.....	85
Figura 2.6. Cromatografía de Exclusión molecular	87
Figura 2.7. Flujograma de trabajo para la purificación de la FEH.....	88

Figura 2.8. Gráfico representativo de la electroforesis de cada paso de la purificación en el primer protocolo	95
Figura 2.9. Gráfico representativo de la electroforesis de cada paso de la purificación en el segundo protocolo.	96
Figura 2.10. Especificidad con la enzima FEH sobre sustrato (A) sacarosa, (B) kestosa y (C) nistosa.	99

CAPITULO 3.

Figura 3.1. Posibles aplicaciones del modelado comparativo en función de los moldes usados. En rojo se muestra el esqueleto peptídico de los modelos, y en azul la estructura real. <i>Fuente: Baker et al., 2001.</i>	112
Figura 3.2. Estrategia para la obtención del ADNc que codifica para la FEH de yacón	117
Figura 3.3. Alineamiento parcial de las secuencias Yacón y KAI376050.1 (Fan <i>et al.</i> , 2022), indicando la región <i>in-silico</i> agregada (en rojo) y el motivo WMNDPNG que contiene.	131
Figura 3.4 Secuencia de aminoácidos predicha de la enzima fructano exohidrolasa (1-FEH) de yacón mostrando los motivos funcionales (en color) y los residuos probables para glicosilación (subrayados).	132
Figura 3.5. Árbol filogenético de la FEH de yacón comparada con otras secuencias de fructano exohidrolasas.....	136
Figura 3.6. Estructura predicha de la FEH de <i>S. sonchifolius</i> (A), comparada con la 1-FEH IIa de <i>C. intybus</i> 1ST8 (B), (Swiss-model expasy), generada con Pymol.	138
Figura 3.7. Sitio activo y residuos críticos de la FEH de <i>S. sonchifolius</i> (A,C), en comparación de los mismos en <i>C. intybus</i> 1ST8 (B,D).	141

Figura 3.8 Estructuras de la 1-FEH IIa de *C. intybus* (A) y la 1-FEH inferida de yacón (B) con los sitios probables de N-glucosilación entre los dos dominios de la proteína. Alineamiento de aminoácidos que se glucosilan con NAG-NAG (C) y con NAG-NAG-MAN3(D) respectivamente, en las dos proteínas**14343**

INDICE DE TABLAS

CAPITULO 1.

Tabla 1.1 Composición de las raíces tuberosas de yacón basada en datos publicados.	12
Tabla 1.2. Datos de las cinco accesiones estudiadas en esta investigación.....	15
Tabla 1.3. Fechas y días después de la siembra en cada cosecha.....	17
Tabla 1.4. Sustratos utilizados para la determinación de actividad enzimática de FEH, SST, FFT e invertasa.....	23
Tabla 1.5. Color de pulpa, color de cáscara y forma de raíces de las cinco accesiones de yacón.	26
Tabla 1.6. Número de raíces por planta de cinco accesiones de yacón durante el periodo de maduración del cultivo.....	27
Tabla 1.7. Peso fresco de raíz y peso total de raíces por planta de las cinco accesiones evaluadas durante el periodo de maduración.	28
Tabla 1.8. Diámetro y longitud de raíces de las cinco accesiones evaluadas durante el periodo de maduración.	30
Tabla 1.9. Materia seca de las raíces de cinco accesiones de yacón evaluadas durante el periodo de maduración.	32
Tabla 1.10. Contenido de sólidos solubles (grados Brix) en raíces de cinco accesiones de yacón evaluadas durante el periodo de maduración.....	33
Tabla 1.11. pH y acidez titulable en las raíces de cinco accesiones evaluadas durante el periodo de maduración.	34

Tabla 1.12. Contenido de fructosa de las raíces de cinco accesiones evaluadas durante el periodo de maduración.	35
Tabla 1.13. Contenido de glucosa de las raíces de cinco accesiones evaluadas durante el periodo de maduración	36
Tabla 1.14. Contenido de sacarosa de las raíces de cinco accesiones evaluadas durante el periodo de maduración	36
Tabla 1.15. Contenido de FOS de las raíces de cinco accesiones evaluadas durante el periodo de maduración	38
Tabla 1.16. Grado de polimerización (GP) de las raíces de cinco accesiones evaluadas durante el periodo de maduración.	48

CAPITULO 2.

Tabla 2.1. Rendimiento proteico y actividad enzimática del extracto de yacón concentrado mediante liofilización.	80
Tabla 2.2. Rendimiento proteico y actividad enzimática del extracto de yacón concentrado mediante ultrafiltración.....	81
Tabla 2.3. Comparativo del rendimiento proteico y actividad enzimática de dos extractos de yacón concentrados por ultrafiltración y por liofilización.	81
Tabla 2.4. Precipitación proteica del extracto de yacón usando sulfato de amonio en diferentes concentraciones	82
Tabla 2.5. Comparación de purificación de la enzima FEH según el primer protocolo utilizando sustratos inulina y kestosa.....	92

Tabla 2.6. Comparación de purificación de la enzima FEH según el segundo protocolo utilizando sustrato inulina.....	93
--	-----------

CAPITULO 3.

Tabla 3.1. Tratamientos evaluados para extracción y purificación de ARN total.....	116
---	------------

Tabla 3.2. Primers diseñados para la obtención del ADNc de la FEH de yacón.	118
--	------------

Tabla 3.3. Comparación de Métodos de Extracción de ARN total a partir de raíces de yacón.....	128
--	------------

Tabla 3.4. Porcentajes del Identidad entre la secuencia de aminoácidos de la FEH de yacón y otras 1-FEH relacionadas p-distancia	134
---	------------

ABREVIATURAS

DDS	Días después de la siembra
FEH	Enzima fructano exohidrolasa
FFT	Enzima fructosa: fructosa 1-fructosiltransferasa
FOS	Fructooligosacáridos
PVPP	Polivinil-polipirrolidona
SST	Enzima sacarosa: sacarosa 1-fructosiltransferasa

RESUMEN

El yacón (*Smallanthus sonchifolius*) es conocido por su alto contenido de fructooligosacáridos (FOS), compuestos prebióticos beneficiosos para la salud. Este estudio analizó la variación de los FOS durante el crecimiento del yacón en Huancayo, Perú, considerando aspectos agronómicos y bioquímicos. Se evaluaron accesiones seleccionadas de yacón desde los seis hasta los doce meses, siguiendo el comportamiento de las enzimas que regulan la acumulación de FOS. Las accesiones evaluadas mostraron los niveles más altos de FOS a los siete meses de cultivo, siendo ACW 5076 y AMM 5163, las accesiones con los valores máximos. En este mismo tiempo una helada afectó el cultivo con la pérdida de la parte aérea, sin embargo, las plantas iniciaron el rebrote a partir del octavo mes. Se observó que los niveles de FOS en las raíces estaban directamente relacionados con la materia seca y los sólidos solubles, e inversamente con el contenido de fructosa en el periodo evaluado. Las actividades de las enzimas del metabolismo de los fructanos se mostraron muy variables entre las accesiones evaluadas. A diferencia de las enzimas de síntesis, la fructano exohidrolasa (FEH) mostró actividad durante toda la evaluación, su actividad se incrementó después de la helada en el octavo mes, sugiriendo que los FOS estarían siendo utilizados para el rebrote de la parte aérea. El trabajo continuó con la caracterización bioquímica de la FEH, se determinó la actividad óptima de la enzima en un rango de pH de 5-6 y en una temperatura de 30 °C. Se logró además purificar a la enzima mediante cromatografía de filtración en gel, seguida por cromatografía de afinidad y de intercambio aniónico, alcanzando una purificación de la enzima de mas de 100 veces, y obteniendo una proteína de 64.84 kDa con actividad FEH. Finalmente, para poder profundizar en

el conocimiento de la enzima, se implementaron las herramientas moleculares para la obtención y clonamiento del ADN complementario (ADNc) y pudo deducirse la secuencia de aminoácidos de la proteína. El análisis filogenético comparativo de la FEH del yacón mostró una alta similitud con su homólogo en *Helianthus tuberosus*, con una identidad de 87.41 %, y se identificaron los residuos activos conservados típicos de la familia de glucósido hidrolasas GH-J (GH-32 y GH-68). Finalmente, se modeló la estructura 3D de la proteína, evidenciando homología con la enzima 1-FEH IIa de *Cichorium intybus*. Los hallazgos de este trabajo son una base importante para desarrollar estudios posteriores que permitan conocer los mecanismos de regulación de la enzima y con ello favorecer la producción de yacón orientada al mercado de alimentos funcionales.

PALABRAS CLAVE: YACÓN, FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS, FRUCTANO EXOHIDROLASA

ABSTRACT

Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) is known for its high content of fructooligosaccharides (FOS), prebiotic compounds that are beneficial to health. This study analyzed FOS variation during yacon growth in Huancayo, Peru, taking into account agronomic and biochemical factors. Selected yacon accessions were evaluated from six to twelve months, tracking the behavior of enzymes that regulate FOS accumulation. The evaluated accessions showed the highest FOS levels at seven months of cultivation, with ACW 5076 and AMM 5163 being the accessions with the highest values. During this same period, a frost affected the crop, resulting in the loss of the aboveground parts; however, the plants began to regrow starting in the eighth month. It was observed that FOS levels in the roots were directly related to dry matter and soluble solids, and inversely related to fructose content during the evaluation period. The activities of the enzymes involved in fructan metabolism varied greatly among the evaluated accessions. Unlike the synthesis enzymes, fructan exohydrolase (FEH) showed activity throughout the evaluation; its activity increased after the frost in the eighth month, suggesting that FOS were being utilized for the regrowth of the aboveground parts. The study continued with the biochemical characterization of FEH; the enzyme's optimal activity was determined to be within a pH range of 5–6 and at a temperature of 30 °C. The enzyme was also successfully purified using gel filtration chromatography, followed by affinity and anion exchange chromatography, achieving a purification factor of over 100-fold and yielding a 64.84 kDa protein with FEH activity. Finally, to further our understanding of the enzyme, molecular tools were implemented to obtain and clone the complementary DNA (cDNA), and the amino acid sequence

of the protein was determined. Comparative phylogenetic analysis of the yacon FEH showed high similarity to its homolog in *Helianthus tuberosus*, with 87.41% identity, and the conserved active residues typical of the GH-J glycoside hydrolase family (GH-32 and GH-68) were identified. Finally, the 3D structure of the protein was modeled, revealing homology with the 1-FEH IIa enzyme from *Cichorium intybus*. The findings of this study provide an important foundation for further research aimed at understanding the enzyme's regulatory mechanisms and thereby promoting yacon production for the functional food market.

KEYWORDS: YACON, FRUCTOOLIGOSACCHARIDES, FRUCTAN EXOHYDROLASE

1. INTRODUCCIÓN

La crisis alimentaria que venimos afrontando actualmente se ha convertido en un problema grave de salud pública, lo que viene impulsando la búsqueda de un suministro sostenible de alimentos para el futuro (Yan *et al.*, 2019). En los últimos años se ha incrementado el interés de los consumidores hacia alimentos que no sólo contengan nutrientes esenciales, sino también sustancias fisiológicamente activas que ayuden a prevenir o reducir ciertas enfermedades (Caballero y Colonia, 2018).

El yacón (*Smallanthus sonchifolius*) constituye un alimento funcional muy valorado por sus propiedades nutricionales y medicinales. Muchos productos a base de hojas y raíces de yacón tienen propiedades antioxidantes, hipoglicemiantes y antibacterianas (Arnao *et al.*, 2011), y están siendo validados con evidencia científica. Por ello, se considera al yacón un cultivo promisorio para el tratamiento de enfermedades como la diabetes, obesidad, cáncer, hipertensión, y arterioesclerosis (De Ford *et al.*, 2015; Gomes *et al.*, 2017; Vélchez *et al.*, 2018; Pan *et al.*, 2025; Pereira *et al.*, 2025).

El consumo de las raíces del yacón involucra el ingreso al tracto digestivo de una dosis alta de fructooligosacáridos (FOS) que llegan intactos al colon, es decir sin ser degradados ni absorbidos, y en esta zona son fermentados por bacterias de la microbiota intestinal asociadas a efectos benéficos en la salud humana (Fernández *et al.*, 2013). Los FOS mejoran el crecimiento de bifidobacterias en el colon y con ello mejoran la absorción de minerales y el metabolismo gastrointestinal (Choque *et al.*, 2013). Cuando estas bacterias actúan, se liberan ácidos grasos de cadena corta que facilitan la absorción de nutrientes como el calcio, el hierro y el magnesio (Gusso *et al.*, 2015). La degradación de estos fructanos, antes de ser consumidos, puede disminuir notablemente las propiedades funcionales del cultivo, lo que terminaría afectando su consumo y comercialización. Esta

degradación está relacionada directamente con la actividad de la enzima fructano exohidrolasa (FEH) y ocurre desde los primeros días de postcosecha. La FEH actúa liberando sucesivamente las moléculas de fructosa que se encuentran en la posición terminal de la cadena de fructooligosacáridos (Valdez *et al.*, 2019). Actualmente se utilizan prácticas agronómicas en el yacón, como el secado de las raíces al sol para favorecer su dulzor o el retardo de la época de cosecha para obtener un mayor peso de raíces, que, si bien apuntan hacia un mercado determinado, disminuyen en ambos casos su valor nutricional, principalmente por reducir el contenido de FOS.

Existen bajos niveles de polimorfismo en el yacón (Mansilla *et al.*, 2006), por lo que la diversidad genética dentro de las accesiones de germoplasma en el Perú es baja (Soto, 2012). Sin embargo, se conoce que el rendimiento de raíces entre las accesiones es altamente versátil como expresión de las diferentes variables en estudio como cultivares, densidad y época de plantación, fertilización, altitud, entre otras (Rodríguez *et al.*, 2022; Santa Cruz *et al.*, 2025). Así también la proporción relativa de FOS fluctúa significativamente durante el ciclo de crecimiento y después de la cosecha, lo cual se evidencia en los diferentes datos publicados (Ohya *et al.*, 1990; Fukai *et al.*, 1993; Fukai *et al.*, 1997; Hermann, *et al.*, 1998; Itaya *et al.*, 2002). Esto sugiere que las enzimas del metabolismo y su regulación podrían jugar un papel fundamental para explicar estas diferencias.

La explotación agronómica e industrial óptima del yacón se ve limitada por la falta de estudios integrales sobre su fisiología, y el conocimiento insuficiente de los mecanismos moleculares y bioquímicos que gobiernan la biosíntesis y degradación de sus FOS. Particularmente, el proceso de hidrólisis de estos fructanos, mediado por la enzima FEH, es de suma importancia porque determina el perfil de carbohidratos y la calidad de las raíces en cuanto a su contenido de FOS. Comprender este proceso en su totalidad, desde

la expresión genética hasta manifestación final de la actividad enzimática y su impacto en el metabolismo de la planta, es fundamental para el desarrollo de variedades mejoradas y bioprocesos más eficientes.

Para abordar esta complejidad de manera sistemática, el presente trabajo de investigación de carácter multidisciplinario se estructuró en tres partes interconectadas, cada una abordando diferentes aspectos. 1) Se estudiaron las características de crecimiento y el metabolismo de los fructanos en diferentes accesiones de yacón durante una campaña de cultivo, con el fin de identificar su comportamiento en la acumulación y degradación de los FOS. 2) Se purificó y caracterizó la enzima FEH determinando sus parámetros cinéticos, especificidad de sustrato y condiciones óptimas de actividad y 3) Se caracterizó molecularmente la enzima FEH de yacón a partir de la obtención del ADNc de sus raíces reservantes, sentando las bases para futuros estudios de expresión génica, y estrategias de mejoramiento genético.

Debido a la naturaleza secuencial y multifacética de esta investigación, los resultados y discusiones se presentan en capítulos independientes. Esta división busca facilitar la comprensión del lector al organizar la información de manera lógica y ordenada, permitiendo una profundización clara en cada uno de los niveles de estudio, sin perder de vista la integración holística de los hallazgos que, en conjunto, contribuyen a esclarecer la fisiología del yacón y a potenciar su valor económico como alimento funcional.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

- Determinar las variaciones del metabolismo de los fructooligosacáridos (FOS) del yacón, con énfasis en la actividad y características de la fructano exohidrolasa (FEH).

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar la variación en el contenido de fructooligosacáridos (FOS) y la actividad de las enzimas del metabolismo de fructanos durante la maduración de las raíces en accesiones seleccionadas de yacón.
- Caracterizar y purificar la enzima fructano exohidrolasa (FEH) del yacón.
- Caracterizar molecularmente la fructano exohidrolasa de yacón a través de la obtención de la secuencia del ADNc.

CAPITULO 1.

VARIACIÓN ESTACIONAL DEL CONTENIDO DE FOS Y DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS INVOLUCRADAS EN ACCESIONES SELECCIONADAS DE YACÓN.

1. RESUMEN

Las múltiples propiedades nutricionales que presenta el yacón se deben en gran parte a su alto contenido de FOS, compuestos prebióticos de gran importancia en la salud humana. En ese contexto, es importante conocer el proceso de acumulación de FOS durante el ciclo de crecimiento del yacón, con la finalidad de establecer su óptimo aprovechamiento. En esta etapa experimental se tuvo como objetivo evaluar la acumulación de FOS en cinco accesiones de yacón, ACW 5076, SAL 136, DPA 07011, AMM 5163 y AME 5186, cultivadas en Huancayo-Perú, desde los seis meses de crecimiento (inicio de la floración) hasta los 12 meses (periodo convencional de cosecha). Se evaluaron adicionalmente las propiedades físicas, químicas y el grado de polimerización promedio. Las actividades FEH-SST-FFT (fructano exohidrolasa-sacarosa sacarosa fructosil transferasa – fructano fructano fructosil transferasa) e invertasa se evaluaron en las accesiones que mostraron alto, medio y bajo contenido de FOS. No se encontraron diferencias significativas en los parámetros peso fresco, diámetro y longitud de raíz, y acidez titulable durante el desarrollo de las cinco accesiones evaluadas. El contenido de azúcares totales y de FOS determinados como porcentaje en base seca fue variable entre las accesiones. La máxima acumulación de FOS se observó a los siete meses de crecimiento de la raíz, alcanzando hasta un 71.7% en base seca en la accesión ACW 5076; sin embargo, se observó una disminución progresiva de los FOS hasta los doce meses en todas las accesiones, aunque con diferente intensidad y con ligeros incrementos en el último mes evaluado. Al término del cultivo, las accesiones AMM 5163 y AME 5186 presentaron el mayor contenido de FOS (41.2 y 28.0 % respectivamente), AMM5163 igualmente destacó con el mayor contenido de materia seca (11.0%). Se evidenció una relación directa entre el contenido de FOS y el contenido de materia seca y sólidos solubles, y una relación inversa con la concentración de fructosa. Las actividades de las enzimas del metabolismo de los FOS

fueron igualmente variables en las accesiones evaluadas. La accesión DPA07011 mostró la más alta actividad FEH y el menor contenido de FOS.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

- Determinar la variación en el contenido de fructooligosacáridos (FOS) y la actividad de las enzimas del metabolismo de fructanos durante la maduración de las raíces en accesiones seleccionadas de yacón.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar morfológica, física y químicamente cinco accesiones de yacón durante el período de maduración de sus raíces.
- Determinar el contenido de FOS, fructosa, glucosa y sacarosa en las cinco accesiones de yacón durante el periodo de maduración de sus raíces.
- Determinar la actividad de las enzimas sacarosa-sacarosa fructosil transferasa (SST), fructano-fructano fructosil transferasa (FFT) y fructano exohidrolasa (FEH) en tres accesiones de yacón durante el período de maduración de las raíces.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Taxonomía y descripción morfológica del yacón

El yacón es una planta de origen andino perteneciente a la familia Asteraceae, también llamada Compositae (Seminario *et al.*, 2003). Inicialmente fue catalogado dentro del género *Polymnia*, propuesto por Linnaeus en 1751. Años después, Robinson adopta una perspectiva diferente para la clasificación de este cultivo y re-establece el género *Smallanthus*, antes propuesto por Mackenzie en 1933 (Grau y Rea, 1997). El género

Smallanthus fue adoptado por Brako y Zarucchi (1993), en su catálogo de plantas del Perú.

Actualmente el yacón se encuentra catalogado como se describe a continuación:

Dominio: Eukaryota

Reino: Plantae

Filo: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida (= Dicotyledoneae)

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Smallanthus*

Especie: *Smallanthus sonchifolius*

El yacón es una hierba perenne de 1.5 – 3 m de altura, con tallos aéreos cilíndricos o subangulares, huecos en la madurez y densamente pubescentes, de color verde a violáceo (Grau y Rea, 1997). Sus hojas son simples, opuestas decusadas y pubescentes. La lámina de las hojas es triangulas simétrica (Mercado *et al.*, 2006).

La rama floral es terminal, compuesta de inflorescencias llamadas capítulos, los cuales contienen a flores tanto masculinas como femeninas. Cada rama puede presentar de 20 – 40 capítulos de color amarillo a anaranjado, y una planta puede formar hasta 80 capítulos (Seminario *et al.*, 2003).

Presenta dos tipos de raíces: fibrosas y reservantes. Las fibrosas son muy delgadas y su función es la fijación de la planta y absorción de nutrientes (Grau y Rea, 1997); mientras que las reservantes son mucho mayores (50 – 1000 g cada una) y llegan a pesar hasta 6

kg en total por planta, si se tiene un buen abonamiento (Amaya, 2002). Estas raíces constituyen la principal parte comestible del yacón, con un agradable y ligero sabor dulce (Manrique *et al.*, 2004). El color de la corteza de las raíces y del tejido reservante varía entre blanco, crema, rosado (estriado), lila y hasta marrón, esto dependiendo del clon (Dostert *et al.*, 2009).

3.2. Distribución geográfica y producción

El yacón es una especie originaria de los Andes, se produce desde Colombia hasta el noreste argentino, incluyendo Bolivia y Perú (Dostert *et al.*, 2009). En el Perú, su cultivo se encuentra en el área altoandina de 17 departamentos: Piura, Cajamarca, Amazonas, Lambayeque, La Libertad, San Martín, Ancash, Huánuco, Lima, Pasco, Junín, Huancavelica, Ayacucho, Apurímac, Arequipa, Cusco y Puno (Seminario *et al.*, 2003), siendo la cuenca de Apurímac un territorio de alta diversidad genética (Dostert *et al.*, 2009). En el periodo de 2015 – 2019 se sembraron 480 hectáreas de yacón por año, con una producción aproximada de diez mil toneladas (Rodríguez López *et al.*, 2022). Las estadísticas oficiales de áreas de siembra del yacón en el Perú son muy escasas. Hasta junio – 2024, en la plataforma para el perfil Productivo Regional que ofrece el Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego, se indica que el rendimiento para el yacón es de 12.84 t. ha⁻¹, con un área cosecha de 308 hectáreas (MIDAGRI, s.f., consultado el 15 de setiembre del 2024).

3.3. Beneficios del yacón

El yacón es una raíz tuberosa andina que no produce almidón, se consume cruda como fruta en los sistemas alimentarios tradicionales (Hermann *et al.*, 1997; De Almeida Paula *et al.*, 2015; Caetano *et al.*, 2016). El grueso de la materia seca de sus raíces consiste en azúcares libres y fructanos de baja polimerización denominados FOS (Hermann *et al.*,

1999). La abundancia de FOS se asocia con beneficios para la salud, ya que éstos pueden ayudar a disminuir el índice glucémico, reducir el peso corporal y bajar el riesgo de cáncer de colon (Pereira *et al.*, 2025). Las propiedades funcionales del yacón, conocidas desde hace mucho tiempo en la medicina tradicional, han sido objeto de diversos estudios e investigaciones clínicas (Caetano *et al.*, 2016).

Por otro lado, la mayor parte de los azúcares solubles en el yacón son de tipo fructosa (Gusso *et al.*, 2015) y, debido a que su consumo no estimula la producción de insulina, es un alimento ideal para dietas de diabéticos (Lachman *et al.*, 2003). Adicionalmente, es un alimento que aporta menos calorías por 100 g. que la mayoría de fuentes de carbohidratos comunes, pudiéndose considerar una alternativa para el control de sobrepeso y la reducción de la obesidad (Gusso *et al.*, 2015, Pereira *et al.*, 2025).

Las raíces y hojas contienen polifenoles con actividad antioxidante, compuestos asociados a la prevención del cáncer y la arteriosclerosis (Valentová *et al.*, 2008, Grancieri *et al.*, 2017, Caballero y Colonia 2018, Myint *et al.*, 2019, Pereira *et al.*, 2025). Hay evidencia en estudios con ratas que la infusión de las hojas de yacón reduce el nivel de glucosa en la sangre, en ratas diabéticas y no diabéticas (Manrique *et al.*, 2004). Por otro lado, las cáscaras del yacón exhiben también una considerable actividad antioxidante, mayor que la pulpa, por lo que es interesante investigarla y caracterizarlas para posibles usos en la industria alimentaria (Khajehei *et al.*, 2018).

3.4. Cosecha y manejo postcosecha del yacón

En el Perú, es una costumbre tradicional realizar la cosecha del yacón de forma manual y exponer las raíces tuberosas al sol (soleado) para que aumenten su dulzor (Cabrera *et al.*, 2019). Por ejemplo, Graefe *et al.* (2004) demostraron que luego de seis días de soleado había un descenso en la materia seca desde 50-62% hasta 29-44%, provocando que el

porcentaje de azúcares libres (fructosa, glucosa, sacarosa) aumente de 29-34% a 45-51%, generando el aumento del dulzor y disminuyendo las concentraciones de FOS.

Para su almacenamiento, se recomienda guardar las raíces tuberosas a bajas temperaturas (4 °C) (Valderrama, 2005). Asami *et al.* (1991) observaron que el contenido de FOS en raíces almacenadas en frío eran mayores que las almacenadas a 25 °C, sin embargo, aún existía una reducción significativa. Es importante la investigación en postcosecha para lograr la mínima reducción de FOS en las raíces.

3.5. Composición química del yacón

Las raíces frescas acumulan principalmente agua y carbohidratos (Manrique *et al.*, 2004), siendo una de las raíces comestibles que más cantidad de agua contienen en peso fresco (> 70 %) (Lachman *et al.*, 2003). De acuerdo a Seminario *et al.* (2003), los carbohidratos representan cerca del 90% del peso seco de las raíces, de los cuales el 40 – 70% son fructooligosacáridos (). El resto de carbohidratos lo conforman la sacarosa, fructosa y glucosa (Hermann *et al.*, 1999), sin embargo, la composición relativa de los diferentes azúcares varía dependiendo del cultivar, la época de siembra y cosecha, tiempo y temperatura post cosecha entre otros. Además de los carbohidratos de almacenamiento, las raíces del yacón contienen pequeñas cantidades de fibra, vitaminas y minerales. (Tabla 1.1)

Tabla 1.1. Composición de las raíces tuberosas de yacón basada en datos publicados.

Componente	A	B	C	D
Carbohidratos (%)	n.d	n.d	9 -13	13.8
Proteínas (%)	0.4 - 2.0	0.1 - 0-5	2.7 - 4.9	1
Grasa (mg/100g)	100 - 300	n.d	112 - 464	100
Agua (%)	70 - 93	85 - 90	n.d	81.3
Energía (kcal)/100g	n.d	14 - 22	15 - 22	n.d
Fibra (%)	0.3 - 1.7	n.d	3.1 - 4.1	0.9
Ceniza (%)	0.3 - 2.0	n.d	4.3 - 6.0	1.1
Potasio (mg/100g)	n.d	185 - 295	180 -290	334
Calcio (mg/100g)	23	6 - 13	56 - 131	12
Fósforo (mg/100g)	21	n.d	182 - 309	34
Hierro (mg/100g)	0.3	n.d	n.d	0.2
Retinol (mg/100g)	10	n.d	n.d	n.d
Caroteno (mg/100g)	0.08	n.d	n.d	0.13
Tiamina (mg/100g)	0.01	n.d	n.d	0.07
Rivoflavina (mg/100g)	0.1	n.d	n.d	0.31
Niacina (mg/100g)	0.33	n.d	n.d	n.d
Ac. Ascórbico (mg/100g)	1.3	n.d	n.d	5
A= Grau y Rea, 1997, B= Manrique <i>et al.</i> , 2004, C= Hermann <i>et al.</i> , 1999, D= Lachman <i>et al.</i> , 2003 n.d= no determinado				
Fuente: Ojansivu <i>et al.</i> , 2011 (modificada)				

3.6. Metabolismo de los fructanos

Los fructanos son sintetizados a partir de la sacarosa por la acción de fructosiltransferasas.

Dos transferasas son responsables de la síntesis de fructanos de tipo inulina: una sacarosa:sacarosa fructosiltransferasa (1-SST) que cataliza irreversiblemente la formación de 1- kestosa a partir de dos moléculas de sacarosa, liberando una de glucosa, y una fructano:fructano fructosiltransferasa (1-FFT), responsable por el elongamiento de

la cadena de fructano, catalizando la transferencia reversible de residuos terminales de fructosa de una molécula donadora a una receptora (Edelman y Jefford, 1968; Van Laere y Van den Ende, 2002). Además de la 1-SST y de la 1-FFT, se han descrito las enzimas que actúan en la biosíntesis de otras formas estructurales de fructanos, la sacarosa:fructano 6- fructosiltransferasa (6SFT) para la síntesis de 6-kestosa, bifurcosa y derivados, y la fructano:fructano 6G fructosiltransferasa (6G-FFT) para la síntesis de neokestosa y los fructanos de inulina de nueva serie (Van den Ende, 2013; Apolinario *et al.*, 2014; Vijn y Smeekens, 1999). Los fructanos son almacenados si la producción de carbono excede la demanda y son movilizados si se requiere energía. (Ritsema y Smeekens, 2003).

La hidrólisis de los fructanos ocurre por la remoción secuencial de los residuos terminales de fructosa por una fructano exohidrolasa (FEH) y sus principales productos son la fructosa y la sacarosa. Las plantas utilizan diferentes FEHs para hidrolizar sus fructanos incluyendo 1-FEHs que preferentemente atacan las uniones fructosil β -2,1, 6FEHs que preferentemente atacan uniones fructosil β -2,6 y las 6&1-FEHs que atacan ambos tipos de enlaces (Van den Ende, 2013). A diferencia de las invertasas, las FEHs no pueden utilizar la sacarosa como sustrato, por el contrario, muchas FEHs son directamente inhibidas por la sacarosa, la cual representa una de las más importantes formas de regulación, cercano al control de la expresión de los genes a nivel transcripcional (Van den Ende *et al.*, 2002, Van den Ende, 2013). En estudios de Khaldari *et al.*, (2018) con *Cichorium intybus* se observó un efecto "antagónico" entre la acumulación de inulina y la actividad enzimática de la 1-FEHIII, sugiriéndolo como punto imperativo de tratar via ingeniería metabólica hacia la mejora del contenido de inulina.

El aumento de la actividad de FEH en los órganos subterráneos de reserva ha sido relacionado con el brote de los órganos aéreos en varias especies de asteráceas, sea

durante el ciclo normal de desarrollo o en el brotamiento inducido por el retiro de los órganos aéreos (Van den Ende *et al.*, 1996, Fukai *et al.*, 1997, De Roover *et al.*, 1999, Portes *et al.*, 2008). Estudios preliminares realizados durante el ciclo fenológico de *V. herbacea* mostraron que FEH presenta actividad elevada en la época de brote, y que la actividad de FEH en los rizóforos de esta planta también podía ser inducida en otras fases fenológicas, a través de la poda y rebrote de sus ramas aéreas y cuando fueron sometidas a bajas temperaturas. (Degasperi *et al.*, 2003, Asega y Carvalho, 2004, Asega *et al.*, 2011) El aumento de la actividad de FEH en plantas de *C. intybus*, otra asterácea, se ha detectado también durante el almacenamiento en frío y en plantas tratadas con soluciones enriquecidas con nitrógeno después de un largo período de deficiencia de este elemento (Van den Ende *et al.*, 1999, Michiels *et al.*, 2004).

3.7. Importancia de los fructooligosacáridos (FOS)

Los fructooligosacáridos del yacón son conocidos por ser medianamente dulces, no tóxicos y no digeribles. En el organismo humano los FOS no se hidrolizan, atraviesan el tracto digestivo sin ser metabolizados proporcionando calorías inferiores a la sacarosa (4-10 Kj/g), cualidad que hace al yacón un alimento excelente para dietas hipocalóricas y dietas para diabéticos (Vilhena *et al.*, 2003; Arango *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2011; Eddouks *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2024). Adicionalmente, experimentos con animales y humanos han evidenciado que la ingesta de los FOS mejoran los niveles de glucosa en la sangre y los lípidos en el suero además de incrementar la absorción de calcio (Lobo *et al.*, 2007; Genta *et al.*, 2009; Mercado, 2014; Zhu *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2025). Los FOS también trabajan como prebióticos estimulando el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos con la consecuente mejora de la microflora intestinal y sus beneficios (Pedreschi *et al.*, 2003).

4. METODOLOGÍA

El cultivo de yacón tuvo lugar en la Estación Experimental La Victoria perteneciente al Centro Internacional de la Papa (CIP) ubicado en la ciudad de Huancayo a 3249 m.s.n.m. (Junín, Perú). El procesamiento de las muestras y los análisis respectivos se realizaron en el Instituto de Biotecnología IBT de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM)

4.1. Material vegetal

Las cinco accesiones de yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl.) estudiadas en esta investigación pertenecen al Banco de Germoplasma del CIP. En la Tabla 1.2 se detalla cada una de las accesiones.

Tabla 1.2. Datos de las cinco accesiones seleccionadas para esta investigación.

DATOS	ACCESIONES				
	ACW 5076	SAL 136	DPA 07011	AMM 5163	AME 5186
Colector	Juan Cruzado	Alberto Salas	David Ponce	Marcial Mendez	Magaly Espejo
Localidad	Bambamarca	Chota	Mallán	Llipta	Chiquián
Distrito	Bambamarca	Chota	Paucartambo	Shilla	Chiquián
Provincia	Hualgayoc	Chota	Pasco	Carhuaz	Bolognesi
Departamento	Cajamarca	Cajamarca	Pasco	Ancash	Ancash
Latitud	06°40' S	06°33' S	10°46' S	09°13' S	10°08' S
Longitud	78°38' W	78°38' W	75°48' W	77°37' W	77°09' W
Altitud (msnm)	2500	2900	3000	3400	3300

4.2. Instalación del campo experimental

Se instaló el campo experimental siguiendo un Diseño de Bloques Completamente al azar (DBCA) considerando cada accesión como un tratamiento, tal como se muestra en la Figura 1.1.

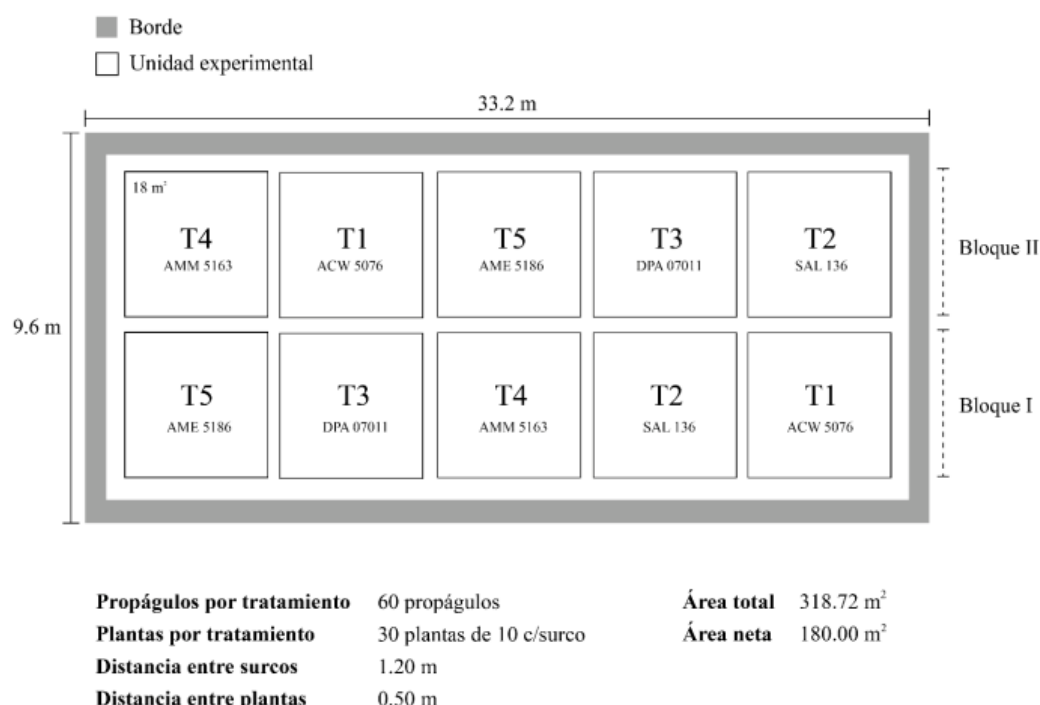


Figura 1.1. Plano de siembra en el campo experimental

Se preparó el terreno con araduras profundas, surcado medianamente profundo y eliminación de malezas tipo perenne. Anteriormente, en este campo se sembró maíz (período 2001-2002), papa (período 2002-2003) y alfalfa (período 2003-2004). La siembra se realizó el 12 de octubre de 2004 utilizando propágulos cortados en fracciones de 10-12 yemas y con peso de 50 a 100 g aproximadamente, provenientes de plantas de 8 meses de edad. Se aplicó guano de ovino como fertilizante orgánico y 60-120-120 kg/ha de nitrógeno, fósforo y potasio como parte de la fertilización química. El deshierbo se realizó de forma periódica y haciendo uso de cultivadoras de mano para evitar el maltrato de las plantas. A los tres meses se aporcó y se aplicó nitrato de amonio a razón de 40 g entre plantas. Durante el desarrollo del cultivo la temperatura media máxima se mantuvo alrededor de los 22.8 °C y las mínimas ocasionaron problemas de heladas en los meses de junio a agosto, alcanzando valores de hasta -5.6 °C. La humedad relativa se mantuvo alrededor del 64.9 % y la precipitación en 100 mm (Estación Huancayo – Campbell en Huancayo, Instituto Geofísico del Perú).

Las cosechas fueron mensuales a partir del sexto mes de crecimiento de las plantas, coincidente con la etapa de floración (Figura 1.2), hasta los doce meses. En la Tabla 1.3 se detalla la fecha de cada cosecha.



Figura 1.2. Campo experimental de yacón a los seis meses de crecimiento

Tabla 1.3. Fechas y días después de la siembra en cada cosecha

Nº	FECHA DE COSECHA	DDS	MES
1	15/04/2005	185	Sexto
2	17/05/2005	217	Séptimo
3	16/06/2005	247	Octavo
4	7/07/2005	268	Noveno
5	9/08/2005	301	Décimo
6	12/09/2005	335	Undécimo
7	10/10/2005	363	Duodécimo

4.3. Etapa I: Análisis físico-químicos del material vegetal

La primera parte del trabajo consta de los análisis físico-químicos que se realizaron en las raíces de cada accesión de yacón en cada cosecha. La metodología se puede visualizar en el siguiente flujograma (Figura 1.3):

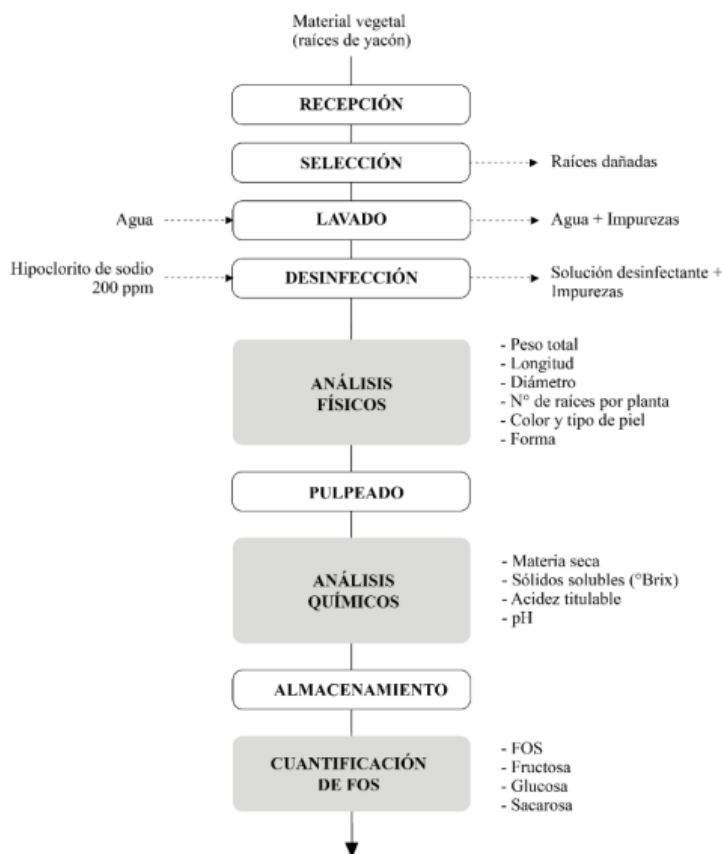


Figura 1.3. Flujograma de trabajo para la determinación de propiedades física y químicas en las raíces de yacón

4.3.1. Acondicionamiento del material vegetal

El acondicionamiento del material vegetal consistió en la selección, lavado, desinfección, pulpeado y almacenamiento de raíces de las accesiones ACW 5076, SAL 136, DPA 07011, AMM 5163, AME 5186. Una vez recepcionadas las muestras se eliminaron las raíces que presentaron daños físicos o microbiológicos. Las raíces seleccionadas fueron lavadas con agua potable para eliminar los residuos de suelo y desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio 200 ppm para eliminar sustancias que podían generar

contaminación. Luego se utilizó una extractora para obtener una pulpa homogénea que permita tomar muestras representativas de cada raíz. Las pulpas se almacenaron a -20 °C.

4.3.2. Determinación de propiedades físicas de las raíces del yacón

Previo a la obtención de las pulpas de las raíces, se evaluaron las siguientes propiedades físicas: peso total, longitud, diámetro, número de raíces por planta, forma, color de piel y color de pulpa (Figura 1.3)

4.3.3. Determinación de propiedades químicas de las raíces del yacón

Las propiedades químicas que se evaluaron fueron: materia seca, humedad, sólidos solubles, pH, acidez titulable. Como se muestra en la Figura 1.3, estos parámetros se evaluaron con la pulpa de raíces.

Materia seca y humedad. La humedad es la cantidad de agua que contiene el alimento. La diferencia entre el peso total del alimento y el contenido de agua se denomina materia seca. Estos parámetros se evaluaron mediante un secado al vacío a 50 °C hasta obtener un peso constante, como lo recomienda la AOAC (1995) para alimentos. Se calculó el porcentaje de humedad según:

$$\% \text{humedad} = \frac{\text{peso fresco} - \text{peso seco}}{\text{peso seco}} \times 100$$

Sólidos solubles (Método AOAC 932.12). En un vaso precipitado se colocó 1 g de pulpa y se agregó 50 mL de agua destilada precalentada a 80 °C, se agitó por 2 minutos en un vórtex y se dejó reposar por un tiempo de 20 min, luego se centrifugó a 3000 rpm, y se tomó una alícuota para la medición de grados Brix con el refractómetro.

pH (Método AOAC 981.12). En un vaso de 100 mL se colocó 1 g de pulpa y se añadieron 50 mL de agua destilada, dejando en reposo por 1 hora con agitaciones suaves. Pasado el tiempo se midió el pH con un potenciómetro.

Acidez titulable (Método AOAC 942.15). Se colocaron 2 g de pulpa en un matraz y se agregaron 100 mL de agua destilada. Se hirvió el matraz por una hora, reponiendo el agua perdida por evaporación. Se enfrió y se transfirió a una fiola de 500 mL y se dejó reposando. Se tomó una alícuota de 20 mL y se realizó una titulación con hidróxido de sodio 0.1 N, usando 0.3 mL de indicador fenolftaleína. Se expresó en porcentaje de ácido cítrico.

4.3.4. Determinación del contenido de glucosa, fructosa, sacarosa y fructooligosacáridos (FOS) en las raíces de yacón

La extracción de los FOS permite la determinación del contenido de glucosa, fructosa y sacarosa en las raíces.

Se tomaron 5 g de la pulpa de raíz fresca homogenizándola con 50 mL de solución extractora (70% de alcohol etílico de 96° y 30% de agua destilada). Se llevó a ebullición durante 10 min y luego se centrifugó a 4000 rpm por 15 min. Se recolectó el sobrenadante y nuevamente se realizó la extracción a la torta. Este proceso se repitió 5 veces (Jaime *et al.*, 2001). El sobrenadante recolectado se filtró al vacío en papel Whatman y se llevó al rotavapor a 50 °C para concentrarlo hasta 30 mL aproximadamente.

Este proceso se realizó por triplicado en cada muestra. Posteriormente fueron llevadas a una fiola de 50 mL y enrasadas con agua ultra pura . Se realizó una hidrólisis enzimática tomando 2700 µL de muestra y 300 µL de inulinasa (baño María a 60 °C durante 3 horas). Tanto la muestra sin hidrolizar como la hidrolizada fueron filtradas para ser analizadas por el equipo de Cromatografía Líquida de Alta Performancia (HPLC) utilizando la columna de 300 x 4 (id) mm-Bondapak/Carbohydrate (Waters Associates, N°84038), como solvente acetonitrilo: agua (85:15) y se utilizó un detector de índice de Refracción.

El cálculo del contenido de FOS se realizó mediante el empleo de una curva de calibración con estándares de fructosa, glucosa y sacarosa a diferentes concentraciones (0.25, 0.5 y 1%). La concentración de fructanos totales fue calculada de acuerdo al método reportado por Hoebregs (1997):

$$G = G_T - (S/1.9) - G_F$$

$$F = F_T - (S/1.9) - F_F$$

Donde, G = glucosa proveniente de los FOS; G_T = glucosa total; $S/1.9$ = glucosa o fructosa de la sacarosa (S); G_F = glucosa libre, F = fructosa proveniente de los FOS; F_T = fructosa total y F_F = fructosa libre.

El contenido total de FOS es igual a la suma de G y F corregida por la pérdida de agua durante la hidrólisis:

$$\text{FOS total} = k (G + F)$$

Donde, $k = 0.925$ (para oligómeros de fructosa)

4.4. Etapa II: Determinación de la actividad enzimática

La segunda parte de esta investigación consistió en la determinación de la actividad de las enzimas SST, FFT, FEH e invertasa en las raíces de tres accesiones de yacón seleccionadas. La metodología se puede visualizar en el flujograma presentado en la Figura 1.4. A continuación, se detalla cada paso:

4.4.1. Acondicionamiento del material vegetal

El acondicionamiento del material vegetal consistió en la selección, lavado, desinfección, pelado, cubitado y almacenamiento de raíces de tres accesiones de yacón previamente seleccionadas por su contenido de FOS. Una vez recepcionadas las muestras se

eliminaron las raíces que presentan daños físicos o microbiológicos. Las raíces seleccionadas fueron lavadas con agua potable para eliminar los residuos de suelo y desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio 200 ppm para eliminar sustancias que podían generar contaminación. Luego se procedió a eliminar la cáscara del yacón y cortar las raíces en forma de cubos. Las raíces se almacenaron a -20 °C.

4.4.2. Extracto enzimático

Se homogenizaron 30 g de raíz en cubos, 10% de PVPP (w/w) y 30 mL de buffer acetato 0.05 M a pH 5 conteniendo 2 mM de 2-mercaptoetanol, 5 mM de ácido ascórbico y 0.02% w/v de azida de sodio (BAM); y se mantuvo la mezcla en reposo durante una hora. Se filtró en nylon doble y se centrifugó durante 20 min (10500 r.p.m. y 4 °C). El sobrenadante recolectado se congeló 24 horas y se liofilizó por un tiempo similar. El extracto liofilizado se disolvió y dializó en BAM durante 24 horas.

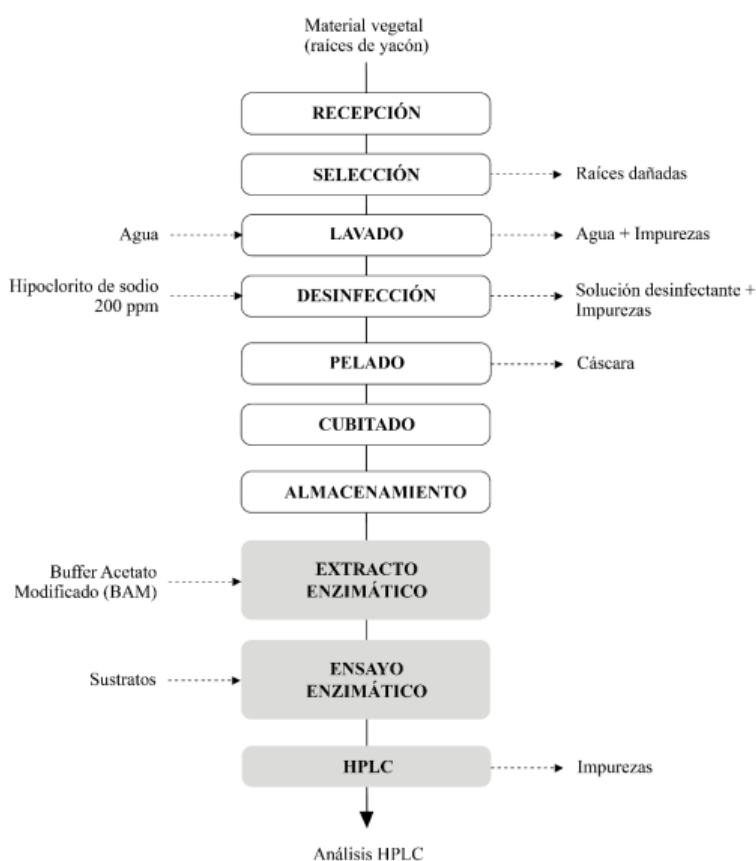


Figura 1.4. Flujograma de trabajo para la determinación de la actividad enzimática en las raíces de yacón

4.4.3. Ensayo enzimático

Para evaluar la actividad enzimática SST, FFT, FEH e invertasa se utilizaron diferentes sustratos disueltos en BAM (Tabla 1.4).

Tabla 1.4. Sustratos utilizados para la determinación de actividad enzimática de FEH, SST, FFT e invertasa.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	SUSTRATO	CONCENTRACIÓN
FEH	Inulina de <i>Dhalia</i> sp. (Sigma)	5% (w/v)
	Kestosa	200 mM
Invertasa	Sacarosa	200 mM
SST	Sacarosa	200 mM
FFT	Kestosa	200 mM

La mezcla de incubación consistió en extracto enzimático y solución de sustrato en proporción 1:1 (v/v). La incubación se realizó a 30 °C en baño maría agitado por seis horas para el sustrato inulina y cuatro horas para los sustratos kestosa y sacarosa. La reacción fue detenida inyectando 30 µL de NaOH 0.1 N y sometiéndola a ebullición durante 5 minutos.

4.4.4. Filtración para HPLC

Para la cuantificación de los productos de reacción se empleó una curva de calibración con estándares de fructosa, glucosa, sacarosa, kestosa y nistosa en diferentes concentraciones. Las muestras fueron filtradas y analizadas mediante Cromatografía Líquida de Alta Performancia (HPLC), empleando la columna Shodex Asahipak NH2P Series (4,6 mm ID x 250 mm), como solvente se utilizó acetonitrilo:agua (70:30) y un detector de índice de Refracción.

Los productos de la reacción enzimática de FEH es la fructosa; de la FFT es nistosa; de la SST es kestosa y de la invertasa es fructosa y glucosa. La actividad de cada una se expresó como μg de producto/ mg de proteína * minuto.

4.4.5. Determinación de contenido de proteína

Se determinó el contenido de proteína en el extracto preparado para determinar la actividad enzimática. Para ello, se preparó el Reactivo de Bradford con 50 mg de Azul Brillante de Coomassie y se le añadieron 25 mL de etanol 96° y 50 mL de ácido ortofosfórico al 85%. Luego se enrasó hasta 500 mL con agua destilada y se mezcló bien y se almacenó en un frasco oscuro (Bradford, 1976).

Para obtener la curva estándar se prepararon soluciones de albúmina de suero bovino (BSA) en BAM, en diferentes concentraciones (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 $\mu\text{g/mL}$). Se tomó 1 mL de cada solución de proteína y se añadieron 3 mL del reactivo de Bradford, dejando reposar por 15 minutos. La lectura se realizó en el espectrofotómetro a 595 nm. El blanco de la reacción consistió en 1 mL de BAM. La curva estándar quedó definida con los valores de $\mu\text{g/mL}$ de proteína y sus valores de absorbancia, tal como se presenta en el Anexo 1. Las muestras fueron tratadas al igual que los estándares y las concentraciones de proteína se calcularon sobre la curva estándar (Bradford, 1976).

4.5. Diseño experimental y Análisis estadístico

Para comparar las principales propiedades químicas de las cinco accesiones de yacón; tales como materia seca, sólidos solubles, contenido de azúcares libres, fructooligosacáridos (FOS) y grado de polimerización (GP) se aplicó un Análisis de varianza multifactorial ($p < 0.05$) para un Diseño de Bloques Completamente al azar (DBCA) con tres repeticiones por tratamiento, calculándose un promedio para cada parámetro.

Para determinar diferencias significativas entre tratamientos y bloques si el ANOVA resultara significativo, se aplicó la prueba de comparación de muestras LSD (Mínima Diferencia Significativa). Asimismo se aplicó ANOVA de medidas repetidas para analizar el comportamiento de las variables evaluadas a través del tiempo de cultivo. Además, se realizaron correlaciones lineales entre materia seca y sólidos solubles, contenido de azúcares y FOS (fructosa-FOS, glucosa-FOS, sacarosa-FOS), así como correlaciones múltiples utilizando el software RStudio para un Modelo Lineal Generalizado (GLM) .

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.6. Evaluación de las características físicas en las raíces de yacón

Se evaluaron mensualmente las siguientes características físicas: color de pulpa y de cáscara, forma de raíces, número de raíces por planta, peso total, diámetro y longitud de raíces de las accesiones ACW 5076, SAL 136, DPA 07011; AMM 5163 y AME 5186 (Tabla 1.5 ,1.6 y 1.7).

En el Perú, los cultivares de yacón se diferencian principalmente por el color de la cáscara y la pulpa de la raíz. La pulpa puede ser de color crema, anaranjado, rojizo, morado o con jaspeados morados, pero predominan más los cultivares de pulpa anaranjada y crema (Manrique *et al.*, 2004), tal y como se observó en este estudio, donde las cinco accesiones presentaron una pulpa de color crema (Figura 1.5). Asimismo, todas las accesiones presentaron una coloración marrón (Figura 1.5) en el color de la cáscara, a excepción de AMM 5163, que era de color morado. Respecto a la forma de raíces, Muñoz *et al.* (2006) mencionan que la mayoría son fusiformes (alargadas) o irregulares. En nuestro estudio, todas presentaron forma alargada, y en algunos casos formas más esféricas.

Tabla 1.5. Color de pulpa, color de cáscara y forma de raíces de las cinco accesiones de yacón.

ACCESIÓN	COLOR DE PULPA	COLOR DE CÁSCARA	FORMA DE RAÍCES
ACW 5076	Crema	Marrón oscuro (tonos rojizos)	Esférica y alargada
SAL 136	Crema	Marrón claro	Alargada
DPA 07011	Crema	Marrón	Alargada y gruesa
AMM 5163	Crema	Morado oscuro	Alargada y gruesa
AME 5186	Crema	Marrón oscuro	Esférica y alargada

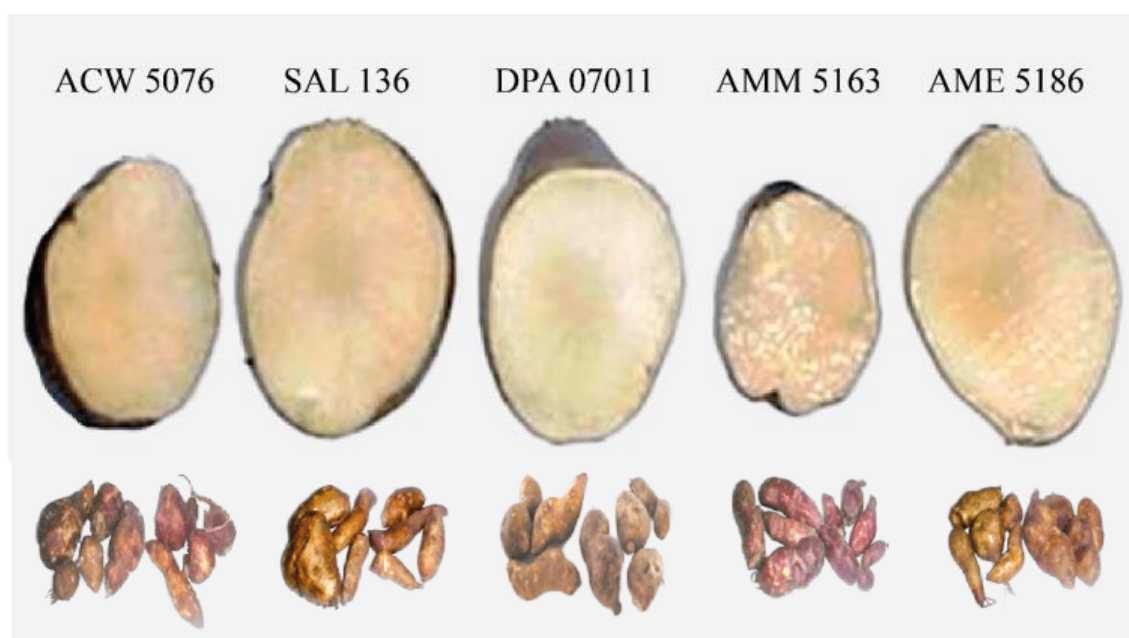


Figura 1.5. Color de pulpa y cáscara de las cinco accesiones de yacón a los doce meses de crecimiento.

El número de raíces para las cinco accesiones fue de 20 raíces/planta en promedio durante todo el período de maduración, siendo la accesión ACW 5076 la que más raíces mostró, aunque no se llegó a diferenciar estadísticamente de las otras. Además, se observó que el periodo en el que más raíces tuvieron las accesiones fue al sexto mes de crecimiento, y mantuvieron valores altos hasta el octavo mes (Tabla 1.6). En este periodo (octavo mes), el rango fue de 20 a 35 raíces por planta, siendo superior al rango de 4-20 reportado por

Grau y Rea (1997); sin embargo, Hermann *et al.*, (1999) encontraron de 20 a 50 raíces por planta en promedio de 10 accesiones de yacón y en el mismo período de crecimiento. Rodriguez *et al.* (2022), no encontraron diferencias sinificativas en el número de raíces entre 8 cultivares evaluados en un solo tiempo de cosecha. En nuestro estudio, la variación temporal del número de raíces por planta durante los 6 meses de cosecha mostró una tendencia a la disminución en todas las accesiones y fue altamente significativa la diferencia entre accesiones al séptimo y noveno mes de cultivo. (Anexo 3)

Tabla 1.6. Número de raíces por planta de cinco accesiones de yacón durante el periodo de maduración del cultivo.

Accesión	Tiempo de crecimiento (meses)							Promedio
	6	7	8	9	10	11	12	
ACW 5076	35	31	35	18	21	17	20	25.3 n.s.
SAL 136	23	24	23	29	11	20	18	21.1
DPA 07011	23	15	20	14	11	20	17	17.1
AMM 5163	35	18	20	24	14	13	14	19.7
AME 5186	27	23	24	13	10	16	14	18.1
Promedio	28.4 ^a	21.8 ^{abc}	24.3 ^{ab}	18.7 ^{abc}	13.1 ^c	16.9 ^{bc}	16.2 ^{bc}	20.3

Promedio de dos plantas por accesión. Promedios con diferente letra indica que son estadísticamente diferentes según Tukey ($\alpha=0.05$).. n.s. no hay significancia.

En relación al peso fresco de las raíces, Graefe *et al.*, (2004) mencionan que generalmente pesan entre 200 y 2000 g mientras que Seminario *et al.* (2003) señalan que pueden fluctuar fácilmente entre los 50 y 1000 g, pero mayormente lo hacen entre los 300 y 600 g. Bajo las condiciones de clima y suelo de este estudio, el peso fresco promedio de raíz en todas las accesiones fue de 101 g, siendo la accesión AME 5186 la que mostró el mayor valor con un promedio de 124.5 g (Tabla 1.7). Sin embargo, la accesión que obtuvo mayor peso total de raíces por planta fue SAL 136 y ACW 5076, pasando los 2 kg raíces/planta. Respecto a la variación temporal en el peso total de raíces por planta en el periodo de crecimiento, se observó el mayor valor de peso total de raíces al séptimo mes, con una tendencia a la disminución pero sin significancia estadística (Tabla 1.7). Kortsarz *et*

al.(2015) evaluando la variación estacional de los azúcares de reserva en yacón (LIEY97-1 de Bolivia) determinaron que el aceleramiento en el crecimiento de las raíces se producía a partir de los 5.6 meses (169 días) de cultivo y se mantenía hasta el final de las cosechas. Por otro lado Vilhena *et al.* (2003), observaron que el proceso de tuberización iniciaba a los 90 días después de la siembra hasta el 4to mes del cultivo con una aceleración del mismo después de la floración a los 7 meses. En el estudio de Rodríguez *et al.* (2022), evaluando el rendimiento de ocho cultivares de yacón a los diez meses de cultivo, encontraron diferencias significativas entre los cultivares tanto en el número como en el peso fresco total de las raíces , atribuyendo este resultado a la variabilidad genética de los cultivares.

Con respecto a la distribución de raíces por peso, se observó a los siete meses de cultivo que el 64% de las raíces tenían pesos menores a 100 g, el 34.5% entre 101 y 500 g y apenas el 1.5% de las raíces superan los 500 g (datos no mostrados). Cabe resaltar que, en este mismo tiempo, ACW 5076 fue la accesión que presentó el mayor porcentaje de raíces con pesos menores a 100 g (70%) y AMM 5163, el mayor porcentaje de raíces con pesos mayores a 100 g. (Figura 1.6).

Tabla 1.7. Peso fresco de raíz y peso total de raíces por planta de las cinco accesiones evaluadas durante el periodo de maduración.

	Accesión	Tiempo de crecimiento (meses)							Promedio
		6	7	8	9	10	11	12	
Peso de raíz (g)	ACW 5076	59.1	93.8	82.6	153.6	67.9	62.7	63.6	83.3 n.s
	SAL 136	62.9	97.8	80.6	74.9	173.9	107.0	117.2	102.0
	DPA 07011	71.1	95.9	149.1	129.4	118.4	99.8	113.9	111.1
	AMM 5163	24.0	126.9	104.3	94.7	66.7	152.6	30.7	85.7
	AME 5186	46.9	114.3	66.2	128.5	218.1	102.8	194.4	124.5
	Promedio	52.8 n.s.	105.8	96.5	116.2	129.0	105.0	103.9	101.3
Peso total de raíces	ACW 5076	2.08	2.73	2.82	2.67	1.40	1.07	1.27	2.01 n.s.
	SAL 136	1.81	2.39	1.80	2.37	1.97	2.10	2.06	2.07
	DPA 07011	1.61	1.45	2.96	1.87	1.64	1.95	1.85	1.90

AMM 5163	0.83	2.03	1.41	2.20	0.99	1.84	1.74	1.58
AME 5186	1.12	2.58	1.55	1.73	2.11	1.57	2.03	1.81
Promedio	1.49 n.s.	2.24	2.11	2.17	1.62	1.71	1.79	1.87

Promedio de dos plantas por accesión. n.s. no hay significancia.

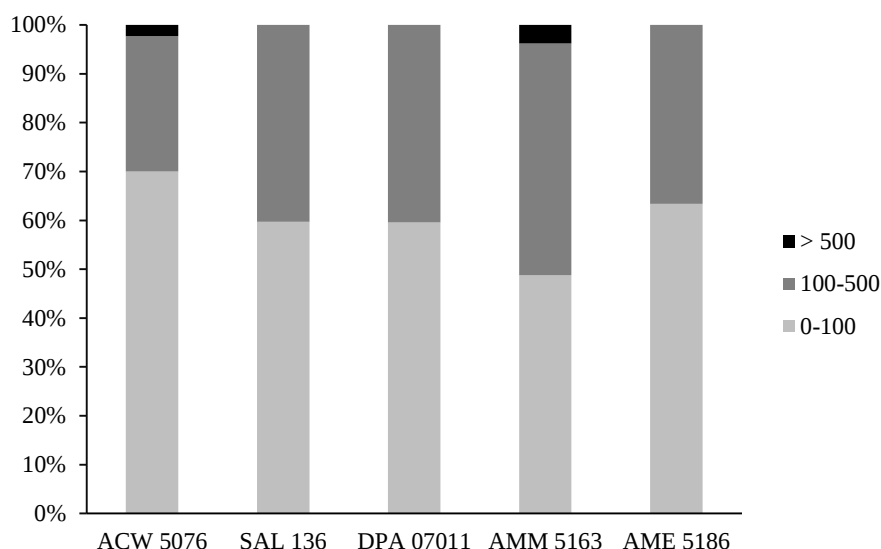


Figura 1.6. Distribución porcentual del peso fresco de las raíces (gramos) en las cinco accesiones a los siete meses de crecimiento.

En este estudio se observó que las accesiones mostraron un valor promedio de 11.7 cm de longitud de raíz, siendo la accesión AME 5186 la que mostró el mayor valor. Al respecto, Grau y Rea (1997) indican que el tamaño de la raíz varía entre 6 a 25 cm. Con el transcurso del crecimiento se produce el ensanchamiento de la raíz cuyo patrón de crecimiento secundario es muy similar al de las plantas dicotiledóneas (Seminario *et al.*, 2003); así, cuando las raíces alcanzan el mayor peso promedio presentan el mayor diámetro (máximo engrosamiento). Por otro lado, el engrosamiento de las raíces se acelera a partir de los 170 días de crecimiento equivalente a los seis meses. En este período, se encontró que los diámetros promedios varían entre 2.1 y 3.3 cm y fueron incrementando hacia el último mes (4 - 5.6 cm) (Tabla 1.8). El test ANOVA de medidas

repetidas mostró un efecto no significativo ($p>0.05$) de los parámetros diámetro y longitud de raíz durante el período evaluado.

Tabla 1.8. Diámetro y longitud de raíces de las cinco accesiones evaluadas durante el periodo de maduración.

	Accesión	Tiempo de crecimiento (meses)							Promedio
		6	7	8	9	10	11	12	
Diámetro (cm)	ACW 5076	3.3	4.0	3.9	4.3	3.5	2.4	4.6	3.7 n.s.
	SAL 136	3.0	4.0	3.9	3.8	4.6	4.5	4.3	4.0
	DPA 07011	3.2	4.4	4.8	4.9	4.1	4.2	4.0	4.2
	AMM 5163	2.1	4.6	3.6	4.1	3.5	5.6	4.5	4.0
	AME 5186	2.3	4.3	3.9	4.3	5.7	4.5	5.6	4.4
	Promedio	2.8 n.s	4.2	4.0	4.3	4.3	4.2	4.6	4.1
Longitud (cm)	ACW 5076	13.20	10.49	9.39	10.88	11.12	10.06	10.32	10.8 n.s.
	SAL 136	12.85	12.19	9.89	9.85	12.65	11.16	12.32	11.6
	DPA 07011	14.55	12.46	11.74	11.01	12.13	11.81	8.88	11.8
	AMM 5163	13.23	11.57	9.82	10.02	10.91	12.60	11.86	11.4
	AME 5186	17.34	12.38	10.38	13.17	12.17	11.04	13.18	12.8
	Promedio	14.2 n.s	11.8	10.2	11.0	11.8	11.3	11.3	11.7

Promedio de dos plantas por accesión. n.s. no hay significancia.

El rendimiento en número de raíces por planta, peso, longitud y diámetro es fuertemente afectado por factores como: morfotipos, propagación de la planta (semilla botánica, cepas o esquejes de tallo), clima (temperatura y humedad) y suelo (contenido de fósforo, nitrógeno, potasio y materia orgánica) (Seminario *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2022). De las Tablas 1.6, 1.7 y 1.8 se observa que estas características no presentan alguna tendencia durante su crecimiento. Sin embargo, se encontró que cuando la planta produce menor número de raíces, en promedio éstas pesan más. Amaya (2002) evaluando el desarrollo de las plantas de yacón en Brasil a 951 m.s.n.m en plantaciones provenientes de yemas axilares o de fragmentos de rizóforos con diferentes espaciamientos entre plantas observó que un mayor rendimiento en número de raíces produce un menor tamaño de ellas. Obtuvo un rendimiento promedio variable en la cosecha a los 8 meses

del cultivo entre los 4 y 12 kg de raíces/planta bajo una densidad de siembra de 0.8m. En nuestro caso, solo se encontró hasta 2.9 kg raíces/ planta para DPA 07011 a los ocho meses de crecimiento (Tabla 1.7) un mes después de la helada. Estas diferencias pudieron estar asociadas tanto al manejo del cultivo como a las diferencias geográficas y las inherentes a las características fenotípicas y genotípicas de las accesiones En el trabajo de Rodríguez *et al.* (2022) se evaluaron, entre otros, los parámetros de rendimiento en peso y número de raíces en 8 cultivares de yacón que se sembraron entre los meses de Agosto y Junio en Cajamarca a 2, 650 m.s.n.m. Los cultivares sufrieron daños por bajas temperaturas a los 4 meses. Esto significó un retraso en el crecimiento de los cultivares y probablemente el efecto principal se expresó en el peso total de raíces, que fue relativamente bajo, comparado con otras investigaciones. Asimismo, ellos observaron una mayor asignación de materia seca a la corona y no a la raíz como mecanismo frente a la condición de estrés, en desmedro del crecimiento de las raíces. En el trabajo de Vilhena *et al.* (2003) se realizó el seguimiento del proceso de tuberización en yacón cultivado a 830 m. de altitud, observaron que este proceso inició a los 90 días posteriores a la siembra de fragmentos de rizóforos. La parte subterránea incrementó hasta el 4^{to} mes, y en el período del 4^{to} al 7^{mo} mes no hubo incremento en el peso del área subterránea coincidente con el máximo desarrollo vegetativo y la floración. Luego de la floración e inicio de la senescencia de la parte aérea se produjo la aceleración de la tuberización hasta el décimo mes.

Tomando en cuenta valores mínimos y máximos en peso fresco, longitud y diámetro de raíces, se observó una alta variabilidad en las accesiones evaluadas, poniendo como ejemplo a la accesión ACW 5076, la cual, a los nueve meses de crecimiento, mostraba raíces desde los 7 g hasta los 1175 g y diámetros que variaban de 1.3 a 12 cm (datos no mostrados).

4.7. Evaluación de las características químicas en raíces

Los resultados obtenidos se muestran de forma detallada en el Anexo 2 con su respectivo análisis estadístico (Anexo 3). Los valores de materia seca para las accesiones variaron en el rango de 5.8 – 17 % durante todo el periodo de maduración con una significancia estadística alta ($p < 0.001$) tanto en su variación temporal como en la diferencia entre accesiones. De ellas, ACW 5076 y AMM 5163 mostraron los mayores valores, 12.8 y 13.7 % respectivamente, diferenciándose estadísticamente de las otras, estos valores fueron superiores al 11.7% en promedio reportado por Rodríguez *et al.* (2022) para los 3 cultivares de yacón con mayor porcentaje de materia seca en raíces. Respecto al tiempo de crecimiento, también se observaron diferencias estadísticas, siendo el séptimo y octavo meses, los meses donde se observaron los valores más altos de materia seca y disminuyendo significativamente a partir del décimo mes en adelante (Tabla 1.9). Estos valores fueron superiores a lo reportado por Hermann *et al.* (1999) para 10 accesiones de yacón a los 8 meses de crecimiento.

Tabla 1.9. Materia seca (g /100 g de raíz) de las raíces de cinco accesiones de yacón evaluadas durante el periodo de maduración.

Accesión	Tiempo de crecimiento (meses)							Promedio
	6	7	8	9	10	11	12	
ACW 5076	13.8	14.6	14.4	14.6	12.9	10.8	8.3	12.7 ^{ab}
SAL 136	11.5	12.9	12.9	12.2	11.4	8.3	7.1	10.9 ^{bc}
DPA 07011	12.1	14.5	12.3	11.6	7.9	5.8	6.3	10.0 ^c
AMM 5163	14.9	16.9	17.0	14.5	11.8	10.1	11.0	13.7 ^a
AME 5186	10.9	13.6	13.0	11.7	10.7	9.1	7.1	10.9 ^{bc}
Promedio	12.6 ^{ab}	14.5 ^a	13.9 ^a	12.9 ^{ab}	10.9 ^b	8.7 ^c	7.9 ^c	11.7

Promedio de tres repeticiones. Promedios con diferente letra indica que son estadísticamente diferentes según Tukey ($\alpha=0.05$). n.s. no hay significancia.

Las raíces presentaron en promedio 8.7 grados brix durante todo el periodo de maduración. La accesión que se destacó fue ACW 5076 con 9.6 grados brix en promedio durante el periodo evaluado y los valores más altos se registraron a los 7 meses para 4 de

las 5 accesiones con un promedio de 11.3 grados Brix. Es importante mencionar que los valores de sólidos solubles se mantuvieron altos hasta el noveno mes, luego disminuyeron significativamente hacia el final del cultivo (Tabla 1.10). Graefe *et al* 2004) reportaron 10.7 °Brix a los nueve meses de crecimiento en la variedad clasificada como “morada”; en nuestro caso, considerando a AMM 5163 dentro de esta clasificación, presentó sólo 7.8 °Brix en ese periodo. Silva *et al.* (2018), trabajando con yacón sembrado en altitudes de 837 y 113 m.s.n.m y diferentes épocas de siembra (otoño, invierno y primavera) observaron que las raíces tuberosas cultivadas a 837 m de altitud, independientemente de las épocas de siembra, presentaron un mayor contenido de sólidos solubles, 12.4°Brix en promedio entre los 6 y 8 meses, probablemente favorecido por la menor temperatura de la zona más alta. Es necesario también considerar que para nuestro estudio la disminución de los sólidos solubles a través del periodo de maduración de las raíces, pudo estar asociado al uso de los sólidos de reserva para el rebrote de la parte aérea como respuesta al daño físico causado por la helada.

Tabla 1.10. Contenido de sólidos solubles (° Brix) en raíces de cinco accesiones de yacón evaluadas durante el periodo de maduración.

Accesión	Tiempo de crecimiento (meses)							Promedio
	6	7	8	9	10	11	12	
ACW 5076	10.5	11.0	9.4	13.0	9.6	7.0	6.4	9.6 ^a
SAL 136	8.7	10.2	9.0	8.0	7.6	8.4	6.0	8.3 ^{ab}
DPA 07011	9.3	11.6	9.2	7.6	6.0	5.0	6.0	7.8 ^b
AMM 5163	11.0	13.4	10.0	7.8	6.0	8.2	8.8	9.3 ^{ab}
AME 5186	9.9	10.4	9.6	8.4	7.6	6.2	7.0	8.4 ^{ab}
Promedio	9.9 ^{ab}	11.3 ^a	9.4 ^{ab}	9.0 ^{bc}	7.4 ^c	7.0 ^c	6.8 ^c	8.7

Promedio de tres repeticiones. Promedios con diferente letra indica que son estadísticamente diferentes según prueba comparativa de Kruskal Wallis ($\alpha=0.05$). n.s. no hay significancia.

Finalmente, se observó que los valores de pH se encuentran entre 5.6 - 6.7 y los valores de acidez titulable (expresados en % ácido cítrico), entre 0.017% - 0.091% para todo el periodo de cultivo. No se presentan diferencias entre las accesiones (Tabla 1.11). El

cambio de pH en las raíces de las cinco accesiones mostraron diferencias altamente significativas ($p < 0.001$) a través del tiempo de evaluación, mientras que la acidez titulable tuvo una variación temporal con una significancia estadística menor ($p < 0.01$) (Anexo 3). En estos parámetros Silva *et al.* (2018) observaron valores promedio de pH en el rango de 6.57- 6.83 con una acidez titulable entre 0.071 y 0.088 titulada con una solución de hidróxido de sodio. Los valores de pH registrados en el presente estudio coinciden con los de Manrique *et al.* (2005) determinados para raíces maduras de la accesión AMM5163.

Tabla 1.11. pH y acidez titulable (% ácido cítrico) en las raíces de cinco accesiones evaluadas durante el periodo de maduración.

	Accesión	Tiempo de crecimiento (meses)							Promedio
		6	7	8	9	10	11	12	
pH	ACW 5076	6.12	6.44	6.44	6.52	6.25	6.36	5.79	6.27 n.s.
	SAL 136	6.02	6.67	6.39	6.19	6.11	6.23	5.74	6.19
	DPA 07011	6.12	6.60	6.46	6.24	6.13	6.24	5.74	6.22
	AMM 5163	6.05	6.42	6.34	5.99	6.26	6.26	5.62	6.13
	AME 5186	6.06	6.49	6.25	6.27	6.01	6.17	5.70	6.14
	Promedio	6.07 ^{bc}	6.52 ^a	6.38 ^{ab}	6.24 ^{ab}	6.15 ^{abc}	6.25 ^{ab}	5.72 ^c	6.19
Acidez titulable	ACW 5076	0.035	0.069	0.061	0.060	0.052	0.052	0.021	0.050 n.s.
	SAL 136	0.048	0.078	0.087	0.056	0.069	0.022	0.035	0.056
	DPA 07011	0.044	0.069	0.083	0.091	0.035	0.017	0.017	0.051
	AMM 5163	0.069	0.074	0.066	0.087	0.052	0.039	0.043	0.061
	AME 5186	0.057	0.069	0.074	0.082	0.052	0.026	0.035	0.056
	Promedio	0.051 ^{ab}	0.072 ^a	0.074 ^a	0.075 ^a	0.052 ^{ab}	0.031 ^b	0.030 ^b	0.055

Promedio de tres repeticiones. Promedios con diferente letra indica que son estadísticamente diferentes según prueba comparativa de Tukey ($\alpha=0.05$) n.s. no hay significancia.

4.8. Evaluación del contenido de fructosa, glucosa, sacarosa y FOS

Los valores de fructosa obtenidos en las cinco accesiones variaron en el rango de 3.8 – 45.0 % para todo el periodo de evaluación con diferencias altamente significativas entre las accesiones (Tabla 1.12). Se observó que la accesión DPA 07011 obtuvo el mayor valor promedio de fructosa (25.2 %), diferenciándose estadísticamente de las otras accesiones.

Así también se observó que el porcentaje de fructosa se incrementó conforme crecían las raíces, siendo el promedio más alto a los doce meses de crecimiento (32.5%) y el más bajo a los siete meses de crecimiento (4.8%). El test de comparaciones múltiples aplicado al test no paramétrico de Kruskal-Wallis con respecto al tiempo de evaluaciones arrojó diferencias altamente significativas del contenido de fructosa entre los seis y diez meses, los siete y nueve meses y entre los ocho y once meses hasta el final de la cosecha (Anexo 3).

Tabla 1.12. Contenido de fructosa (% base seca, b.s) de las raíces de cinco accesiones evaluadas durante el periodo de maduración.

Accesión	Contenido de fructosa (% b.s)							Promedio
	Tiempo de crecimiento (meses)							
	6	7	8	9	10	11	12	
ACW 5076	8.2	4.7	9.9	14.4	14.7	19.6	35.0	15.2 ^{ab}
SAL 136	14.1	4.3	11.7	18.6	17.7	26.7	34.4	18.2 ^{ab}
DPA 07011	15.2	4.2	18.6	21.0	35.0	37.7	45.0	25.2 ^a
AMM 5163	7.7	3.8	8.6	13.9	19.5	25.1	17.5	13.7 ^b
AME 5186	7.8	7.2	12.0	17.7	21.7	23.2	30.7	17.2 ^{ab}
Promedio	10.6 ^{de}	4.8 ^e	12.2 ^{cde}	17.1 ^{abcd}	21.7 ^{abc}	26.5 ^{ab}	32.5 ^a	17.9

Promedio de tres repeticiones. Promedios con diferente letra indica que son estadísticamente diferentes según prueba de media de Kruskal Wallis ($\alpha=0.05$) n.s. no hay significancia.

El contenido de glucosa fue menor al de fructosa en casi todo el periodo de evaluación, desde los siete meses de crecimiento en adelante (Tabla 1.13). Las accesiones SAL 136 y DPA 07011 mostraron los mayores valores promedio de glucosa (8.5 y 8.7% respectivamente), mientras que ACW 5076 y AMM 5163 obtuvieron los menores valores. El máximo valor de glucosa alcanzado (15%) se observó en la accesión SAL 136 a los 6 meses de crecimiento. En general, se observó que el valor del contenido de glucosa fue variable para todas las accesiones a lo largo del crecimiento de las raíces con diferencias altamente significativas. En el test múltiple comparativo con respecto al tiempo de evaluación se observó alta significancia para el periodo comprendido entre la séptima y última cosecha (Anexo 3). Estos resultados sugieren que el contenido de glucosa como

resultado del metabolismo de síntesis de oligofructanos se ha mantenido durante toda la etapa de maduración de raíces junto al metabolismo degradativo.

Tabla 1.13. Contenido de glucosa (% base seca) de las raíces de cinco accesiones evaluadas durante el periodo de maduración

Accesión	Contenido de glucosa (% b.s)							Promedio
	Tiempo de crecimiento (meses)							
	6	7	8	9	10	11	12	
ACW 5076	7.6	0.0	2.9	3.2	3.8	0.9	2.4	3.0 ^c
SAL 136	15.0	6.0	8.1	8.1	7.6	6.1	8.3	8.5 ^a
DPA 07011	12.7	0.0	9.9	7.6	12.7	6.0	12.1	8.7 ^a
AMM 5163	7.5	0.0	1.3	4.3	4.3	2.8	2.8	3.3 ^c
AME 5186	7.9	0.0	5.7	7.4	5.9	6.9	11.6	6.5 ^{ab}
Promedio	10.1 ^a	1.2 ^c	5.6 ^{ab}	6.1 ^{ab}	6.9 ^{ab}	4.5 ^{bc}	7.4 ^{ab}	6.0

Promedio de tres repeticiones. Promedios con diferente letra indica que son estadísticamente diferentes según prueba de media de Kruskal Wallis ($\alpha=0.05$) n.s. no hay significancia.

El valor máximo de contenido de sacarosa se observó en la accesión AMM 5163 a los 12 meses de crecimiento (10.3%). Asimismo, la accesión con mayor promedio de sacarosa fue AME 5186 (6.4%) y la que tuvo menor promedio fue DPA 07011 (2.3%). Se observó también que hubo un incremento gradual en el contenido de sacarosa durante la maduración de las raíces (Tabla 1.14). El test no paramétrico mostró diferencias significativas en el contenido de sacarosa para las accesiones AMM5163 y AME5186 con respecto a la accesión DPA07011. El test múltiple de comparación arrojó diferencias significativas desde el sexto y séptimo mes hasta el final del periodo de evaluación (Anexo 3).

Tabla 1.14. Contenido de sacarosa (% base seca) de las raíces de cinco accesiones evaluadas durante el periodo de maduración

Accesión	Tiempo de crecimiento (meses)							Promedio
	6	7	8	9	10	11	12	
ACW 5076	0.0	0.0	6.2	6.0	6.1	7.3	9.9	5.1 ^{abc}
SAL 136	0.0	0.0	0.0	5.1	6.9	5.5	9.9	3.9 ^{abc}
DPA 07011	0.0	0.0	0.0	6.9	4.6	0.0	4.5	2.3 ^c

AMM 5163	6.4	0.0	4.9	6.1	5.8	9.7	10.3	6.2 ^{ab}
AME 5186	0.0	8.0	6.8	5.7	7.7	8.7	7.8	6.4 ^a
Promedio	1.3 ^c	1.6 ^{bc}	3.6 ^{bc}	6.0 ^{abc}	6.2 ^{ab}	6.2 ^{ab}	8.5 ^a	4.8

Promedio de tres repeticiones. Promedios con diferente letra indica que son estadísticamente diferentes según prueba de media de Kruskal Wallis ($\alpha=0.05$) n.s. no hay significancia.

Caballero y Colonia (2018) indican que la composición química de los azúcares libres en yacón puede ser considerada de la siguiente forma: fructosa 3.9 – 21.1 %, glucosa 2.3 – 5.9 % y sacarosa 10 – 19 %. Esto concuerda parcialmente con nuestro estudio, donde se observaron valores promedio de 17.9 % para fructosa, 6.0 % para glucosa y 4.8 % para sacarosa. Los valores más bajos de estos azúcares se encontraron al séptimo mes de crecimiento, coincidente con la acumulación máxima de FOS en las raíces. Por otro lado, la relación fructosa / (sacarosa + fructosa) fue mayor a 0.5 en todas nuestras evaluaciones para todas las accesiones, indicándonos que, desde los seis meses de maduración de las raíces, las cinco accesiones tuvieron baja concentración de sacarosa. Esto difiere con lo observado por Kortsarz *et al.* (2015) en su estudio de variación estacional de los azúcares en el yacón en el cual encontraron una proporción fructosa / (sacarosa + fructosa) mayor a 0.5 a los diez meses de crecimiento. Es probable que esta diferencia se deba a que el cultivo en mención no sufrió daño en la parte aérea como ocurrió en nuestro estudio, forzando a la despolimerización de los FOS para el rebrote y el resultante aumento de la fructosa.

El contenido de FOS para las cinco accesiones varió en el rango de 6.6 – 71.7 % durante todo el periodo de evaluación con diferencias significativas entre las accesiones. (Tabla 1.15). El test de comparaciones múltiples considerando el tiempo de evaluación mostró diferencias altamente significativas entre períodos mensuales desde los seis, siete y ocho meses hasta el fin de las cosechas. La accesión ACW 5076 fue la que registró el más alto contenido de FOS en promedio (50.8), mientras que la accesión DPA 07011 obtuvo el menor valor promedio (33.6%). Asimismo, se observó que los FOS aumentaron conforme

se desarrolló el cultivo, con un valor promedio de 67.6% a los siete meses y al finalizar el estudio disminuyó a 23.2%. La degradación de los FOS comenzó a los ocho meses de crecimiento, coincidente con los daños en el cultivo producidos por la helada y la consiguiente demanda energética del cultivo para el rebrote. Un comportamiento similar aunque sin los efectos de una helada fue observado en el estudio de Itaya *et al.* (2002) con una máxima acumulación de FOS en raíces a los siete meses del cultivo y la posterior caída hasta los diez meses en la última cosecha coincidente con la completa senescencia de la parte aérea. Asimismo, Chirinos (1999), evaluando las características físico-químicas en raíces de yacón de diferentes estados de madurez (cinco, siete y nueve meses de desarrollo vegetativo) procedentes de tres zonas geográficas del Perú: Tarma, Cuzco y Chachapoyas, observó que el contenido de oligofructanos disminuyó conforme se acentuaba la madurez de la raíz y que los valores fueron más altos en las zonas frías de Tarma y Cuzco.

Tabla 1.15. Contenido de FOS (% base seca) de las raíces de cinco accesiones evaluadas durante el periodo de maduración

Accesión	Contenido de FOS (% b.s)							Promedio
	Tiempo de crecimiento (meses)							
	6	7	8	9	10	11	12	
ACW 5076	64.3	71.7	55.0	57.8	51.3	34.3	21.3	50.8 ^a
SAL 136	50.9	67.6	50.5	43.5	40.6	16.3	19.1	41.2 ^{ab}
DPA 07011	45.4	69.7	45.1	40.8	19.5	7.9	6.6	33.6 ^b
AMM 5163	45.6	68.2	62.6	56.4	45.5	28.6	41.2	49.7 ^{ab}
AME 5186	60.3	61.0	48.6	36.7	40.4	26.3	28.0	43.0 ^{ab}
Promedio	53.3 ^{ab}	67.6 ^a	52.4 ^{ab}	47.0 ^{bc}	39.5 ^{bcd}	22.7 ^d	23.2 ^d	43.7

Promedio de tres repeticiones. Promedios con diferente letra indica que son estadísticamente diferentes según prueba de media de Kruskal Wallis ($\alpha=0.05$) n.s. no hay significancia

Comparando los valores de fructooligosacáridos con el contenido de azúcares de las raíces de yacón pudo observarse que los valores de FOS fueron considerablemente

mayores a la cantidad de glucosa y sacarosa, sin embargo, con respecto a la concentración de fructosa, los valores de FOS sólo fueron mayores hasta el décimo mes de crecimiento. El yacón almacena los carbohidratos en mayor proporción como fructooligosacáridos, y en menor proporción como azúcares libres, es decir glucosa, sacarosa y fructosa (Sarmiento-Rubiano *et al.*, 2023). Es probable que, en los dos últimos meses, la degradación de FOS provocara un aumento de la concentración de fructosa. Vilhena *et al.*(2003), observaron los contenidos de fructosa, sacarosa y 1-kestosa elevados en las raíces de yacón a los siete meses de cultivo, a los nueve meses se incrementaron los niveles de monosacáridos y disminuyeron los contenidos de oligofructanos kestosa y nistosa sugiriendo la ocurrencia de la despolimerización de los FOS que se intensificó a los diez meses. Por su parte, Chirinos (1999), obtuvo mayores contenidos de glucosa, fructosa y sacarosa al incrementarse el grado de madurez de las raíces, siendo la fructosa el azúcar que mayores incrementos presentó, desde 5.6 en la primera cosecha a los cinco meses hasta 26.9% en la última cosecha a los nueve meses.

Los indicadores de la época de cosecha son el amarillamiento de las hojas y el cese de la floración, que se da entre los ocho y doce meses (Cabrera *et al.*, 2019). Los resultados de este trabajo muestran que las accesiones presentaron la máxima acumulación de FOS a los siete meses, con un rango de 61.0 – 71.7 %, lo que supondría ser ésta una época óptima para cosechar las raíces y aprovechar la alta concentración de FOS. De manera similar Kortsarz *et al.*, (2015) determinaron que las raíces cosechadas a los 210 días (~siete meses) poseen las mejores condiciones para ser consumidas como alimentos hipocalóricos porque se registró la mayor cantidad de FOS (GP<5) así como Yuanita *et al.*, (2020) concluyen que a una altura de 1800 m.s.n.m. la mejor época para cosechar el yacón es a los ocho meses, cuando hay una alta concentración de FOS.

Los órganos aéreos del yacón no soportan las heladas y evidencian daños bajo temperaturas desde -1 °C (Dostert *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2022), sin embargo, este cultivo presenta una excelente capacidad de rebrote (Seminario *et al.* 2003). El daño físico causado en la planta genera que ésta emplee sus carbohidratos de reserva para el rebrote y para reparar los daños (Fukai *et al.*, 1997). La accesión DPA 07011 mostró la caída de FOS más pronunciada disminuyendo un 35% en el octavo mes con respecto al mes anterior, mientras que AMM 5163 fue la más homogénea frente al daño de la helada, pues sólo disminuyó un 8% en el mismo mes. (Tabla 1.15). Se observó además que tanto la accesión AMM5163 como las accesiones AMM5186 y SAL 136 mostraron un incremento en el contenido de FOS en el último mes de cosecha (12 meses del cultivo), lo cual coincidió con el aumento del peso de raíces en las dos últimas accesiones (Tabla 1.7; Figura 1.7). En los cultivos de yacón bajo condiciones ausentes de friajes, la acumulación de los FOS se hace intensiva después de la floración coincidente con el inicio de la senescencia de la parte aérea. Sin embargo, Vilhena *et al.* (2003), observaron una disminución del contenido de FOS en raíces hacia el final del cultivo, asociándolo al rebrote de los rizóforos y la despolimerización de los FOS.

Graefe *et al.* (2004), reportan un estudio realizado en la ciudad de Huánuco (1990 m.s.n.m) y Huariaca (2930 m.s.n.m.) indicando que a los nueve meses obtuvieron 49.8%, 53.8% y 62.1% de FOS en tres variedades clasificadas como “amarilla”, “morada” y “blanca”, respectivamente. En este trabajo, clasificando a AMM 5163 como “morada” se encontró 56.4% de FOS en el mismo periodo a pesar del daño causado por la helada. Por su parte Mascoco *et al.* (2025) extrayendo los FOS de yacón de dos localidades de producción en Bagua-Amazonas (429 m.s.n.m.) y Pachitea-Huánuco (3040 m.s.n.m.), obtuvieron un jarabe con mayor contenido de FOS en esta última localidad, sin encontrar diferencias genéticas detectables entre los dos cultivares utilizados en las dos zonas.

4.9. Correlación entre azúcares totales, materia seca, sólidos solubles y FOS

La Figura 1.7 muestra la variación del contenido de fructosa, glucosa, sacarosa y FOS durante el crecimiento de las cinco accesiones. Debido a que el proceso de degradación de FOS libera cantidades importantes de fructosa (Chirinos *et al.*, 2017) se puede observar la relación inversa: a mayor contenido de FOS hay un menor contenido de fructosa y viceversa.

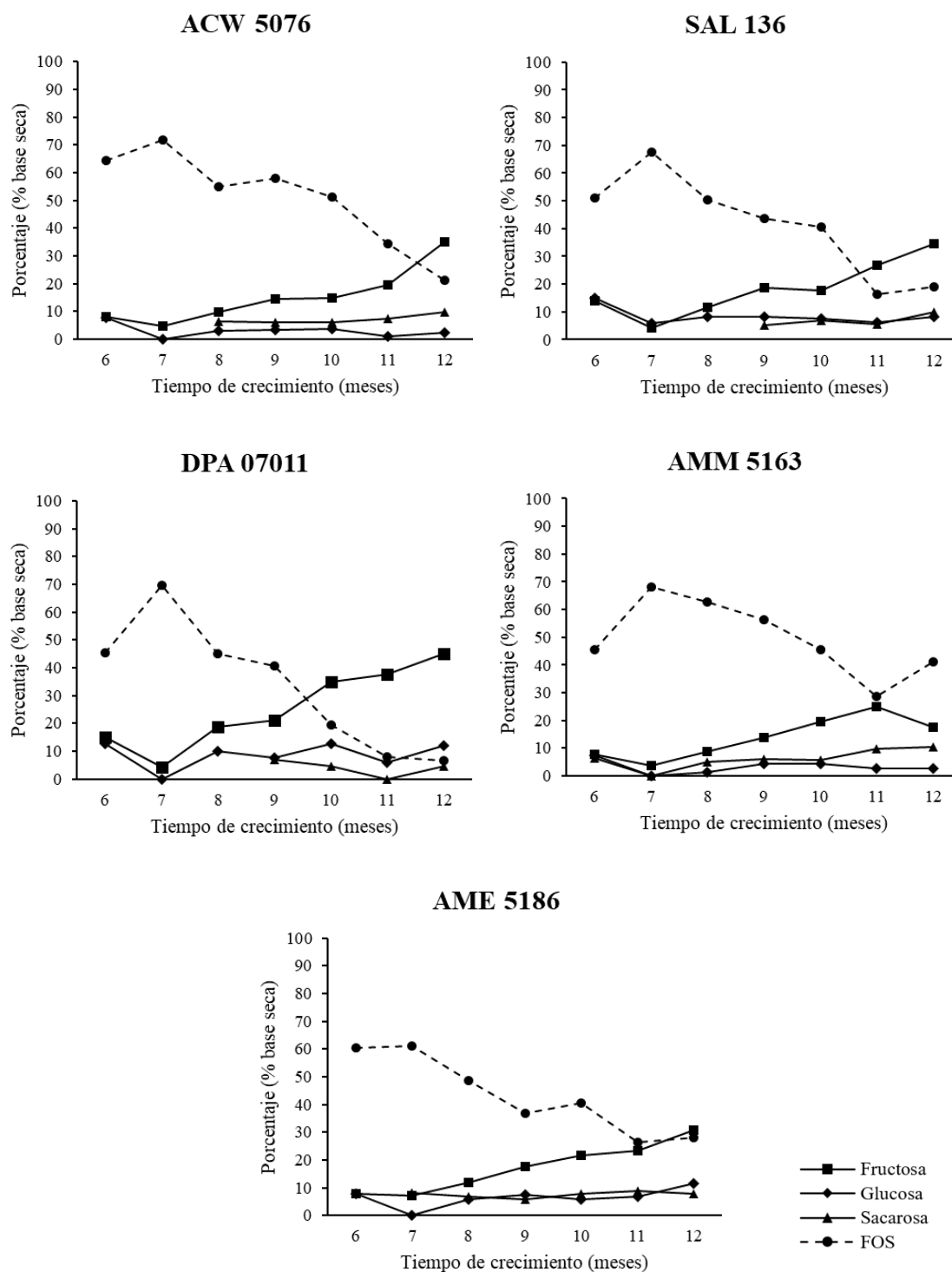


Figura 1.7. Variación de fructosa, glucosa, sacarosa y FOS (% b.s) de cinco accesiones de yacón desde los seis hasta los doce meses de crecimiento.

El coeficiente de Pearson para el contenido de fructosa y FOS (Figura 1.8A) nos confirma la relación inversa entre ambos parámetros. Las variaciones en el contenido de FOS

pueden explicarse en un 87% por las variaciones del contenido de fructosa. En el caso de glucosa y sacarosa no se observa una fuerte correlación con los FOS (Figura 1.8B, 1.8C). El análisis de regresión múltiple (Anexo 3) comprobó la asociación lineal del contenido de FOS con respecto al contenido de fructosa en todas las accesiones durante el periodo evaluado (Figura 1.8D). (Anexo 3). Estos resultados fueron nuevamente analizados a través de un modelo lineal generalizado (GLM) el cual permitió el ajuste de los datos a un modelo Gamma (Link Log.) dándole un valor predictivo (Anexo 3). El modelo Gamma con enlace log permite interpretar los coeficientes como efectos multiplicativos sobre FOS. En la Figura 1.8E la línea vertical en 1 representa ausencia de efecto, puede notarse que todas las variables presentan intervalos de confianza que no cruzan el valor 1, lo que indica efectos estadísticamente significativos. La fructosa muestra una relación negativa dominante, con respecto a los FOS de manera clara. Los azúcares glucosa y sacarosa presentan una relación positiva con el contenido de FOS, siendo mayor para la sacarosa. En conjunto, el gráfico confirma que la composición de azúcares refleja de forma diferencial y proporcional el contenido de FOS en las raíces de yacón.

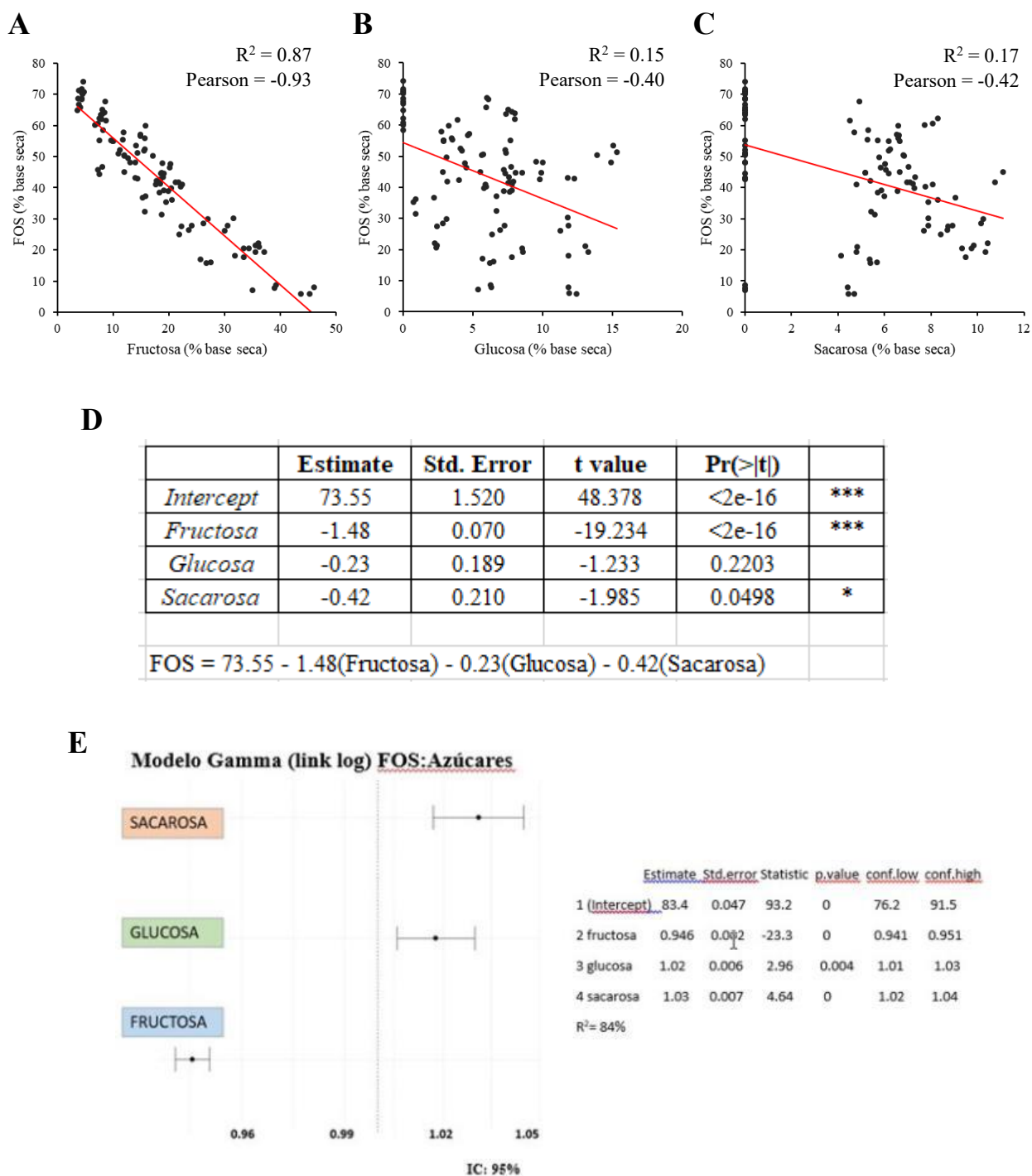


Figura 1.8. Correlación lineal entre el contenido de FOS y fructosa (A), glucosa (B) y sacarosa (C). Análisis de regresión múltiple (D). Modelo Lineal Generalizado para la relación FOS :azúcares fructosa, glucosa y sacarosa (E).

Respecto al contenido de materia seca y sólidos solubles, la Figura 1.9 muestra que hay una relación directa con el contenido de FOS, es decir, mientras los FOS se degradan, la

materia seca y los sólidos solubles disminuyen también. El yacón almacena los carbohidratos en forma de fructooligosacáridos, y éstos representan hasta el 70% de la materia seca (Kamp *et al.*, 2019), por lo cual, al disminuir la materia seca, el contenido de los FOS disminuye también. Los grados Brix (°Brix) expresan la concentración de sólidos solubles (generalmente azúcares) disueltos en una muestra. En el caso del yacón, los FOS representan el mayor componente de los azúcares en el jugo (Manrique *et al.*, 2005), es por ello que con la disminución de la concentración de FOS, se reduce también la cantidad de sólidos solubles.

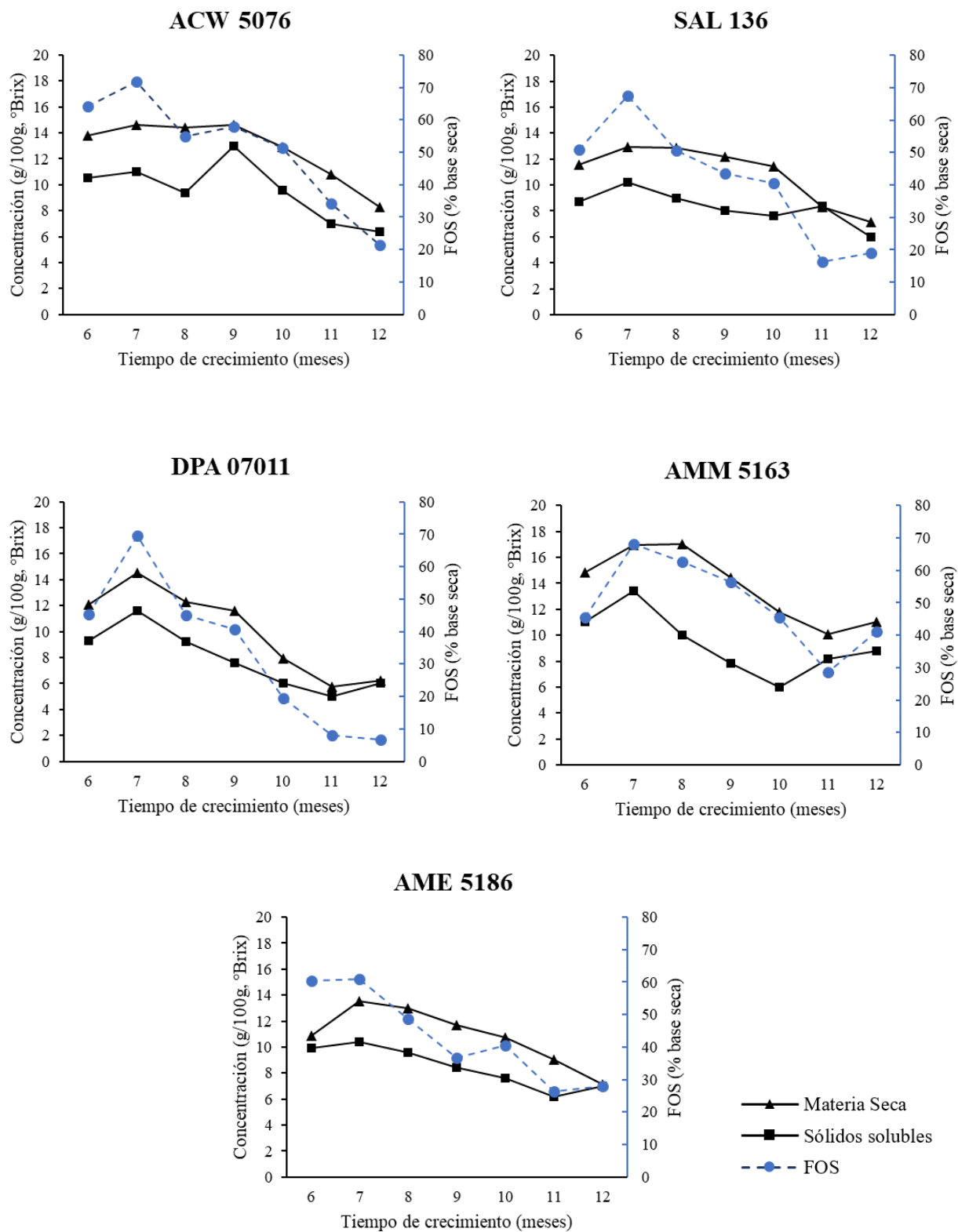


Figura 1.9. Variación de materia seca (%), sólidos solubles (°Brix) y FOS (% base seca) de cinco accesiones de yacón desde los seis hasta los doce meses de crecimiento.

El coeficiente de Pearson para la materia seca, sólidos solubles y FOS (Figura 1.10) nos confirma la relación directa entre los parámetros. Las variaciones en el contenido de FOS pueden explicarse en un 80% por las variaciones de la materia seca y en un 66% por las variaciones en el contenido de sólidos solubles.

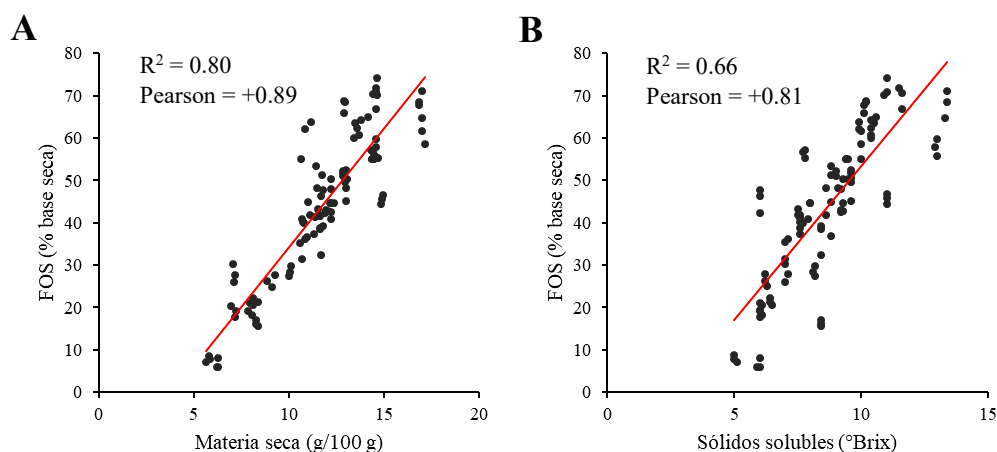


Figura 1.10. Correlación entre el contenido de materia seca (A), sólidos solubles (B) y FOS.

4.10. Evaluación del grado de polimerización promedio

La Tabla 1.16 presenta el grado de polimerización promedio de las raíces durante su maduración a partir de los seis meses. Se observa que los valores varían en un rango de 1.8 – 4.8 para todo el periodo del cultivo, mostrando un incremento hacia el término de la cosecha, si bien se observaron diferencias altamente significativas entre las accesiones, no se observó significancia en relación al tiempo de evaluación. Los valores registrados en este trabajo son más bajos que lo reportado por Vilhena *et al.* (2003), quienes observaron en yacón fructanos con GP = 12 a los siete meses de crecimiento, y GP=15 a los 8 meses, mientras que las accesiones de este estudio presentaron en promedio un GP = 2.8 a los siete meses. En el trabajo de Chirinos (1999) se reporta la disminución del grado de polimerización conforme maduran las raíces de yacón a los 5 ,7 y 9 meses de

crecimiento con valores promedio de 6.02, 5.06 y 3.99, respectivamente. Por su parte Kortsarz *et al.* (2015), observaron que en cosechas tempranas de yacón, antes de la floración, el grado de polimerización de los FOS fue menor a 4, mientras que en las cosechas tardías los FOS en raíces tuvieron un GP mayor a 5. En general, los fructooligosacáridos de cadena corta ($GP < 5$) son más apreciados en la industria porque pueden ser rápidamente metabolizados y poseen mayor actividad bifidogénica en comparación a los de cadena larga (Tochio *et al.*, 2018), esto permite numerosas aplicaciones tecnológicas para el tipo de fructooligosacáridos presentes en el yacón (Fonseca *et al.*, 2015).

La acumulación de los FOS de un determinado GP se encuentra definido por las características de las actividades FFT y FEH según Itaya *et al.* (2002). Considerando la degradación continua de los FOS por la acción de la enzima FEH y el ligero aumento en el GP durante el desarrollo del cultivo, es probable que estas enzimas hayan actuado simultáneamente. Comparando las accesiones estudiadas, se observó que ACW5076 y AMM 5163 tuvieron mayor grado de polimerización al final de la evaluación.

Tabla 1.16 Grado de polimerización (GP) de los FOS de cinco accesiones evaluadas durante el periodo de maduración.

Accesión	Grado de Polimerización							Promedio
	Tiempo de crecimiento (meses)							
	6	7	8	9	10	11	12	
ACW 5076	3.2	2.7	3.6	3.9	4.3	4.5	4.8	3.9 ^a
SAL 136	2.8	3.2	3.3	3.2	3.3	3.4	3.7	3.3 ^{ab}
DPA 07011	2.8	2.6	3.1	3.2	2.4	1.8	3.5	2.8 ^b
AMM 5163	3.5	3.1	3.3	3.8	3.7	4.2	4.1	3.7 ^a
AME 5186	2.9	2.5	3.4	3.6	3.8	3.7	2.4	3.2 ^{ab}
Promedio	3.0 n.s	2.8	3.3	3.5	3.5	3.5	3.7	3.4

Promedio de tres repeticiones.

4.11. Evaluación de actividad enzimática FEH, FFT, SST e invertasa

Se determinó la actividad enzimática de las enzimas fructano exohidrolasa (FEH), fructano – fructosil transferasa (FTT), sacarosa-sacarosa fructosil transferasa (SST) e invertasa en tres accesiones: ACW 5076, SAL 136 y DPA 07011, las cuales fueron seleccionadas por su contenido de FOS: alto, medio y bajo, respectivamente (Anexo 4).

Las actividades enzimáticas están expresadas en un determinado producto de reacción; sin embargo, es importante considerar el modelo de Edelman y Jefford (1968), en el cual la actividad de estas enzimas están relacionadas y los productos generados pueden a la vez ser sustratos de otra enzima. Según este modelo, la enzima SST cataliza la transferencia de un grupo fructosil a la sacarosa, produce 1-kestosa y libera unidades de glucosa; la enzima FFT, que es responsable de la elongación de la cadena, puede emplear la kestosa y transferir un grupo fructosil a otra molécula liberando sacarosa, y la enzima FEH, que cataliza la hidrólisis de los FOS, libera fructosa y residuos fructosil (n-1). Esta fructosa podría igualmente emplearse para la resíntesis de sacarosa, y los residuos fructosil (n-1) ser sustrato para actividad FFT adicional. Si bien este modelo no considera actividad SST y FEH al mismo tiempo; Cairns *et al.*, (1997) citados por Itaya *et al.* (2002), reportan que la actividad FEH en hojas de *Lolium temulentum* induce la síntesis de fructanos demostrando que ambos procesos, síntesis y degradación, pueden darse al mismo tiempo en un mismo tejido.

Los cromatogramas del extracto simple e hidrolizado de las cinco accesiones se muestran en el Anexo 5. En las Figuras 1.11, 1.12 y 1.13 se presentan como ejemplo los cromatogramas de la actividad de las enzimas estudiadas. Puede observarse la actividad FEH sobre sustrato inulina en la accesión ACW 5076 a los ocho meses de crecimiento de la planta (Figura 1.11) y sobre sustrato kestosa en la accesión DPA 07011 a los 10 meses

de crecimiento (Figura 1.12); en ambos casos, la aparición de fructosa evidencia el producto de la reacción enzimática.

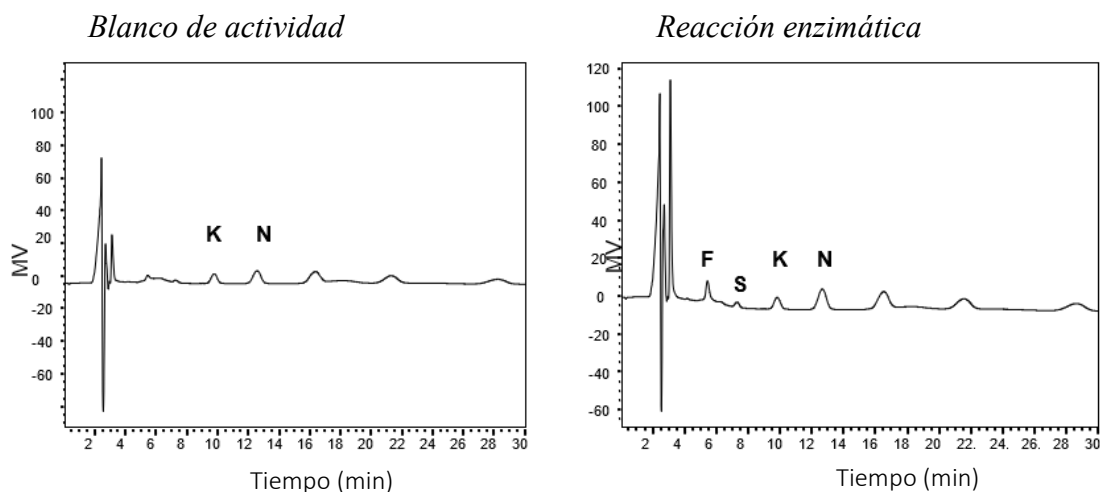


Figura 1.11. Cromatograma de la actividad FEH sobre inulina para la accesión ACW 5076 a los ocho meses de crecimiento.

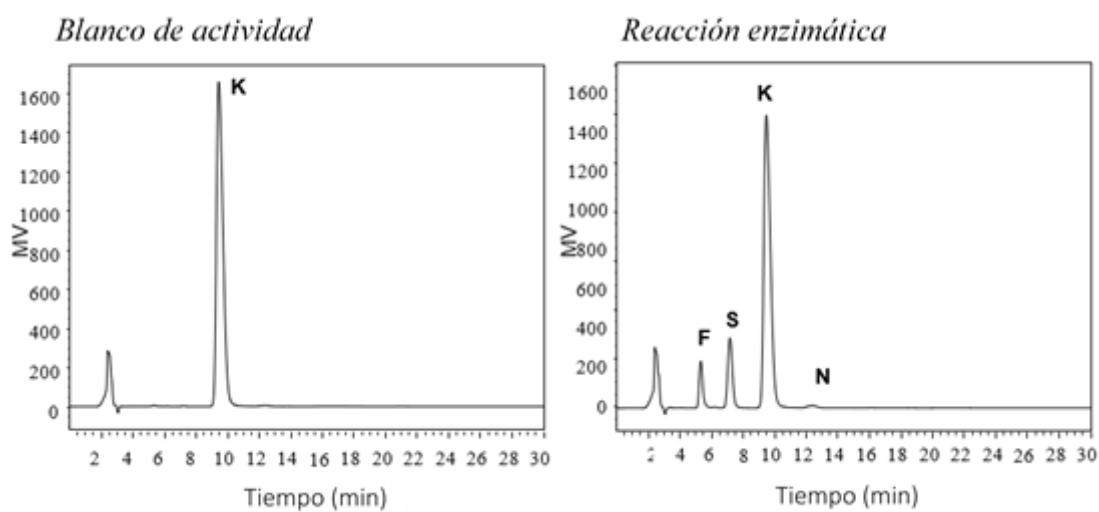


Figura 1.12. Cromatograma de la actividad FEH sobre kestosa para la accesión DPA 07011 a los diez meses de crecimiento.

Donde K = kestosa, N = nistosa, F = fructosa y S = sacarosa

La Figura 1.13 presenta los cromatogramas para determinar actividad FFT en la accesión ACW 5076 a los siete meses de crecimiento, donde la aparición de nistosa indica su actividad.

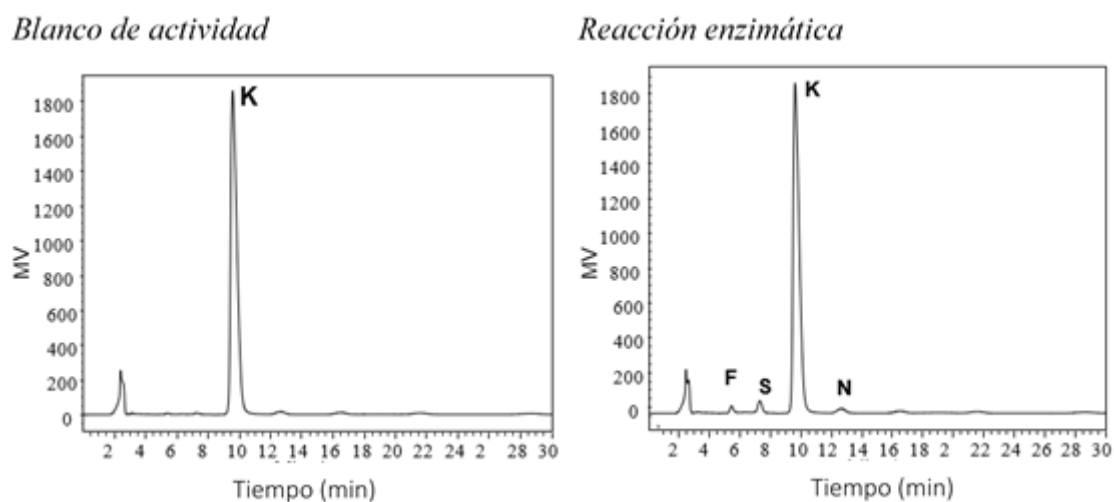


Figura 1.13. Cromatograma de la actividad FFT sobre kestosa para la accesión ACW 5076 a los siete meses de crecimiento.

Se observa que las enzimas FEH, FFT, SST e invertasa presentaron alta actividad (Fig. 1.14 y 1.15), sin embargo, es necesario evaluar el efecto de sus actividades bajo un comportamiento integrado. Por ejemplo, Fukai *et al.* (1997), en estudios realizados en Japón, indicaron que durante el verano la cantidad acumulada de fructanos fue mínima a pesar de una alta actividad específica de SST y FFT. Puede considerarse entonces que la acumulación de FOS y de los diferentes azúcares es producto del comportamiento de este grupo de enzimas, con una alta influencia de las condiciones ambientales predominantes. Por otro lado, Itaya *et al.* (2002), señalan que tanto el tipo como la concentración de fructooligosacáridos en el yacón podrían ser controlados por la relación entre la biosíntesis y la degradación, variando esta última durante el crecimiento de las raíces.

Sugieren además que los niveles relativos de estas enzimas pueden estar involucrados en la distribución de las moléculas de fructanos y la longitud de su cadena.

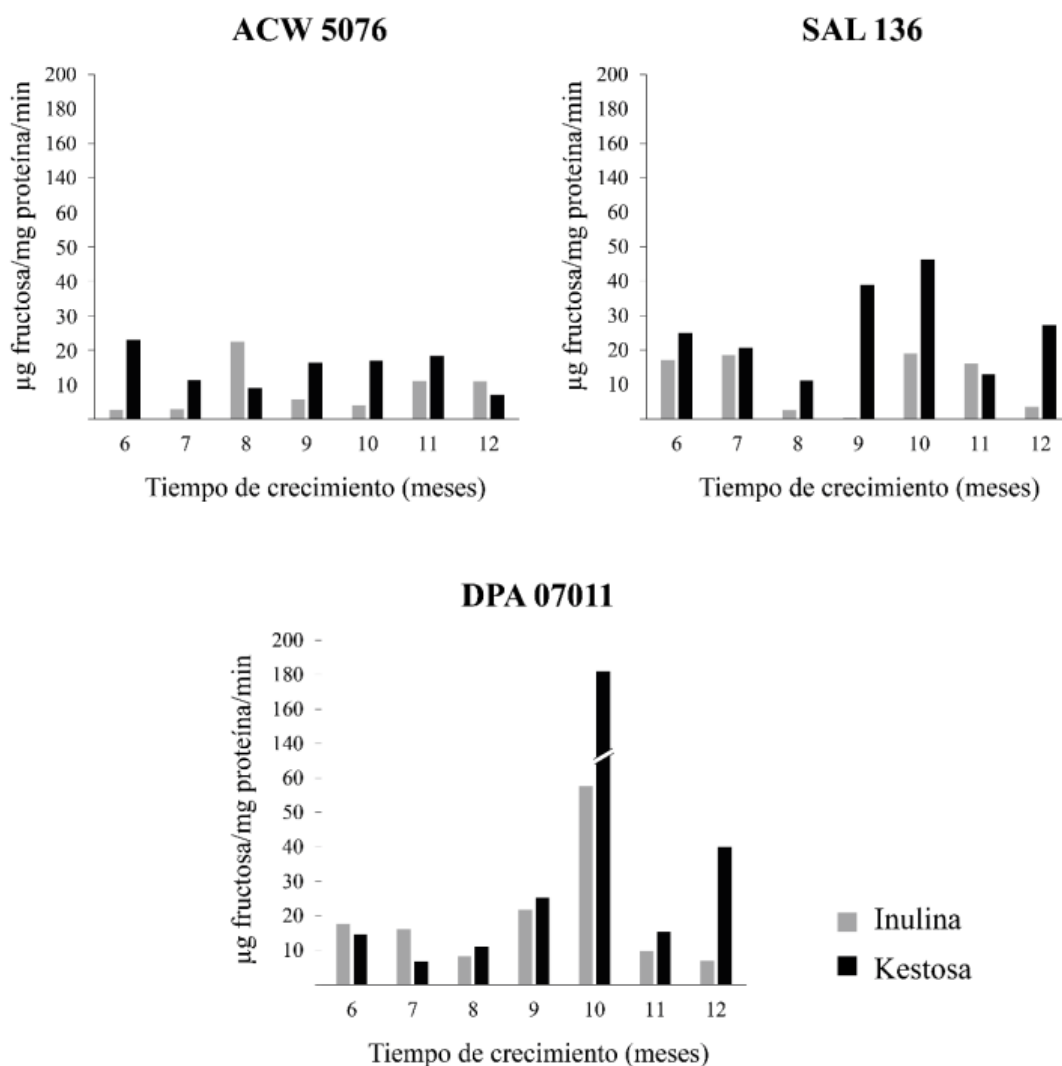


Figura 1.14. Actividad enzimática de fructano exohidrolasa (FEH) sobre sustrato inulina y kestosa evaluada en tres accesiones de yacón desde los seis hasta los doce meses de crecimiento. * Significancia según Test ANOVA ($\alpha = 0.05$). n.s. no hay significancia.

La Figura 1.14 muestra la actividad de la FEH sobre sustrato inulina y kestosa en cada una de las accesiones evaluadas desde el sexto mes hasta los doce meses de crecimiento. Se observó la actividad de esta enzima durante todo el periodo de evaluación y que es más alta cuando se mide con kestosa como sustrato. Esto puede atribuirse a una diferencia de afinidad por el sustrato dado que la inulina es un compuesto que naturalmente está

ausente en el yacón. Itaya *et al.* (2002), mencionan que la actividad de la FEH depende, entre muchos factores, de la afinidad de ésta sobre el sustrato. En ambos sustratos, DPA 07011 es la accesión con mayor actividad de la enzima, la cual está directamente relacionada con el nivel más alto de degradación de los FOS.

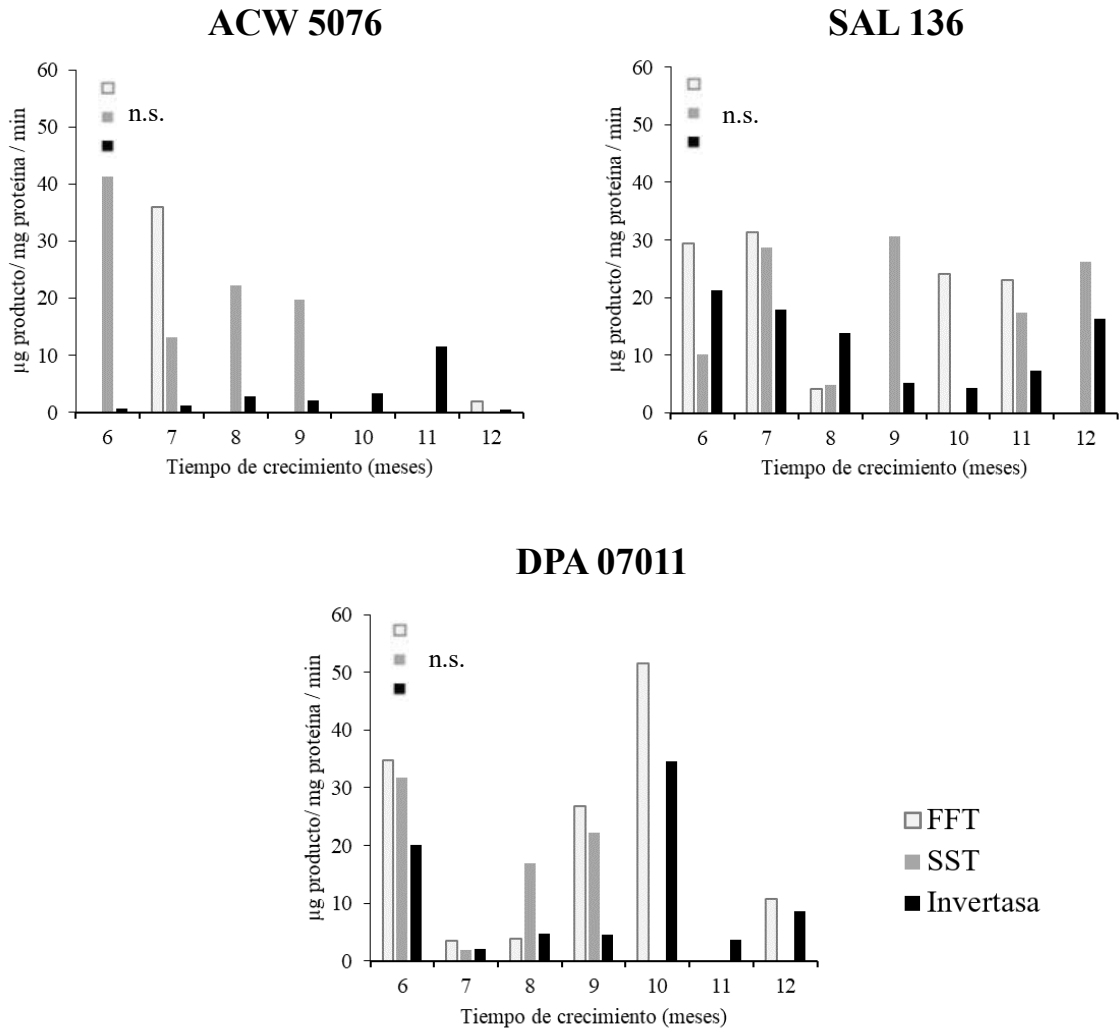


Figura 1.15. Actividad enzimática de FFT, SST e invertasa evaluada en tres accesiones de yacón desde los seis hasta los doce meses de crecimiento.

Por otro lado, la Figura 1.15 muestra la actividad enzimática de FFT, SST e invertasa para tres acciones de yacón seleccionadas. Se observa que DPA 07011 posee una alta actividad invertasa, que junto con la elevada actividad FEH, podrían explicar el gran contenido de

fructosa determinado en las raíces y su baja acumulación de FOS, en relación a las otras accesiones evaluadas.

Los contenidos de FOS en plantas de yacón han sido consignados para las diferentes accesiones de la colección de germoplasma del Centro Internacional de la Papa, y de acuerdo a ella la accesión ACW 5076 es considerada un morfotipo de alto FOS (Dr. Carlos Arbizu, CIP, comunicación personal). A los seis meses de crecimiento de las plantas, se observó que la accesión ACW 5076 tuvo el mayor contenido de FOS, aparentemente debido a un temprano inicio del engrosamiento de sus raíces (Tabla 1.15). A diferencia de las demás accesiones, ACW 5076 no presentó actividad FFT (Figura 1.15), lo que concuerda con lo reportado por Itaya *et al.* (2002) quienes señalan que la acumulación de altas cantidades de FOS está acompañada por la baja actividad FFT en una relación SST/FFT mayor de 1. En las accesiones SAL 136 y DPA 07011 se observa actividad FFT (Figura 1.15), esta enzima de manera individual daría lugar al incremento en el GP de los fructanos de las raíces, sin embargo, es evidente que su acción estuvo asociada a las otras enzimas del metabolismo de los fructanos, incluyendo la invertasa, dados los valores en el contenido de fructosa glucosa, sacarosa y GP determinados (Tabla 1.12 a 1.16).

En el séptimo mes de crecimiento, las tres accesiones presentaron actividad FEH pero en niveles bajos (Figura 1.14), una disminución en la cantidad de fructosa libre en las raíces y el máximo contenido de FOS (Tabla 1.14). Habiéndose producido ya la floración, estos valores reflejan el punto máximo de crecimiento de la planta y acumulación de fructanos con la consiguiente traslocación hacia las raíces. En el trabajo de Vilhena *et al.* (2003) se realizó el seguimiento del proceso de tuberización en yacón cultivado a 830 m. de altitud, observaron que este proceso inició a los 90 días posteriores a la siembra de fragmentos de rizóforos. La parte subterránea incrementó hasta el cuarto mes, y en el periodo del cuarto al séptimo mes no hubo incremento en el peso del área subterránea coincidente

con el máximo desarrollo vegetativo y la floración. Luego de la floración e inicio de la senescencia de la parte aérea se produjo la aceleración de la tuberización hasta el décimo mes.

A los ocho meses, cuando las plantas de este estudio sufrieron el efecto de la helada, se observó la presencia de glucosa en las raíces, lo cual aparentemente estaría indicando actividad SST, que transfiere los residuos de fructosa de una sacarosa a otra, liberando glucosa. Sin embargo, el efecto más notorio en este mes fue la caída en el contenido de FOS (hasta un 24.6% en DPA 07011) y el aumento significativo de la fructosa libre debido a la actividad FEH (Tablas 1.12 y 1.14). Esta alta degradación de FOS puede atribuirse a su uso como carbohidratos de reserva para la formación de nuevos brotes ante los daños de la helada o aspectos propios de la accesión. Resultados similares se observaron en el estudio de Fukai *et al.* (1997), quienes señalan que la actividad FEH incrementó marcadamente con el rebrote de las partes aéreas y la cantidad de FOS decreció después del daño físico causado por un tifón. Van den Ende *et al.* (2001) señalan que la actividad FEH puede resultar inducida después de una defoliación y ocasionar la movilización de los fructanos desde la parte subterránea a la parte aérea. Cabe destacar sin embargo, que en condiciones de ausencia de heladas, Itaya *et al.* (2002) observaron actividad FEH durante toda la etapa de maduración de raíces, característica que podría contribuir al predominio de fructanos de bajo DP en el yacón y se opone a lo observado en la mayoría de las especies de Asteraceae que acumulan fructanos.

Las plantas mantuvieron actividad SST después de la defoliación hasta el noveno mes junto al rebrote del follaje y continuó la degradación de FOS en las raíces vía actividad FEH. A partir del décimo mes, en ACW 5076 no se detectó actividad FFT ni SST y se observó una degradación continua de FOS. Itaya *et al.*, (2002) reportaron igualmente que

los valores de actividad de SST y FFT declinaban a medida que el contenido de FOS disminuía.

La presencia de sacarosa en las raíces de SAL 136 y DPA 07011 (Tabla 1.14) incrementada hasta el mes 12 podría deberse a su actividad FFT, sin generar un aumento significativo en el GP (Tabla 1.16), ya que esta enzima es intermediaria para transferir unidades de fructosa hacia sacarosa u oligosacáridos de bajo peso molecular (De Roover *et al.*, 1999). Se destaca en DPA 07011 la elevada actividad FEH (Figura 1.14) produciendo el aumento significativo de fructosa en las raíces (Tabla 1.12) y la mayor disminución en el contenido de FOS (Tabla 1.15).

En el mes once de crecimiento, el contenido de FOS disminuyó en las tres accesiones aparentemente debido a la actividad FEH. Este comportamiento es válido teniendo en consideración que la hidrólisis de los FOS puede ser consecuencia directa de la actividad fructano exohidrolasa, con la liberación del residuo fructosil de las cadenas de fructooligosacáridos (Degasperi *et al.*, 2003, Fukai, *et al.*, 1997). Sin embargo, para el caso de SAL 136, la considerable caída del contenido de FOS en 24.3% podría deberse también a la actividad FFT registrada. La disminución en el contenido de sacarosa en sus raíces (Tabla 1.13) puede deberse tanto por la actividad SST como por la actividad invertasa y FFT (Figura 1.15); si bien, esta última no puede usar sacarosa como donador de fructosa, podría usarla como aceptor de fructosa (Ritsema y Smeekens, 2003). Aparentemente estas enzimas estarían actuando en conjunto porque no hay un aumento significativo en el GP (Tabla 1.16).

A los doce meses de cultivo en ACW 5076 hay aparentemente una acción conjunta de las enzimas FEH, FFT e invertasa debido a la disminución en el contenido de FOS y aumento en el contenido de fructosa, glucosa y sacarosa respecto al mes anterior. De acuerdo al

modelo citado por Edelman y Jefford (1968), FFT junto a FEH catalizan la depolimerización de fructanos al final de su desarrollo y durante el almacenamiento. Si bien la FEH degradando los FOS provocaría una disminución en el GP de los fructanos resultantes, probablemente la FFT empleó fructanos de bajo grado de polimerización como donadores de fructosa para elongar la cadena de polímeros. Esto explicaría el aumento de sacarosa en las raíces y que el GP se mantenga constante en promedio (Tabla 1.16). Al respecto, Itaya *et al.* (2002), señalan que, si bien no debe ignorarse la intervención de la enzima FEH, en diferentes especies el GP de fructanos acumulados en los órganos de almacenamiento se debe principalmente a la FFT.

Puede observarse que en SAL 136 y DPA 07011 se produce aparentemente una acción conjunta de la enzima FEH e invertasa. Se encontró una elevada actividad FEH para DPA07011 sobre el sustrato kestosa en el mes 10 de cultivo (Figura 1.14), e igualmente actividad invertasa elevada (Figura 1.15). Esto explicaría el aumento del contenido de sacarosa en las raíces, así como el de glucosa y fructosa adicionales por la acción invertasa utilizando la molécula de sacarosa liberada por la FEH. En general un aumento significativo de sacarosa en los tejidos puede inhibir la enzima FEH de acuerdo a Marx *et al.* (1997a), sin embargo, la elevada actividad invertasa en este caso pudo haber evitado tal inhibición.

En la accesión SAL 136 se encontró una elevada actividad SST (Figura 1.15) en los últimos 2 meses de cultivo a diferencia de las otras dos accesiones. Esta actividad en etapas tardías del cultivo no es común y podría justificarse para plantas que continúan en rebrote por daño en el follaje como ocurrió en este estudio, aunque fue solo notoria para esta accesión. De acuerdo a la actividad SST se esperaría el aumento en el contenido de glucosa y kestosa junto a un aumento en el GP de los fructanos por actividad de la FFT.

Sin embargo, en esta accesión no se produjo una variación significativa en el GP (Tabla 1.16) sugiriendo que la kestosa producida estaría siendo empleada por la FEH.

Es importante considerar que en general las actividades de las fructosiltransferasas como la SST y FFT, pueden ser influenciadas por la disponibilidad y concentración del sustrato y por diversos factores reguladores como el pH y temperatura, entre otros (Portes *et al.*, 2008; Márquez-Lopez *et al.*, 2023). Así, se ha podido observar que los cambios en los azúcares glucosa y fructosa pueden disminuir la actividad de la 1-FFT (Trevisan *et al.*, 2015), mientras que la actividad SST estará siempre inducida por la presencia de sacarosa como su sustrato primario (Vijn y Smeekens, 1999; Trevisan *et al.*, 2015)

5. CONCLUSIONES

- Las accesiones ACW 5076, SAL 136, DPA 07011, AMM 5163 y AME 5186 presentaron una alta variabilidad en el contenido de materia seca, sólidos solubles, fructosa, glucosa, sacarosa y fructooligosacáridos en el tiempo de evaluación.
- Las mismas accesiones no mostraron diferencias significativas en el peso, diámetro y longitud de raíces, pH y acidez titulable.
- La máxima acumulación de fructooligosacáridos se observó a los siete meses de cultivo en todas las accesiones. Al finalizar el ensayo, las accesiones ACW 5076 y AMM 5163 mostraron el mayor contenido promedio de FOS.
- Las raíces de las cinco accesiones disminuyeron en general su contenido de FOS hacia el final del cultivo a los doce meses, sin embargo, la accesión AMM 5163 mantuvo la concentración de FOS más homogénea en el tiempo de evaluación.
- La accesión DPA 07011 tuvo la actividad FEH más alta alcanzando los mayores niveles de fructosa libre y un bajo contenido de FOS al término de la evaluación.
- Las actividades SST, FFT e invertasa fueron variables en las accesiones AMM5163, SAL136 y DPA07011. Su comportamiento pudo estar asociado a la pérdida de follaje seguido del rebrote a partir del octavo mes de cultivo y a las características genéticas de cada accesión.

CAPITULO 2

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y PURIFICACIÓN DE LA FRUCTANO EXOHIDROLASA (FEH) DE YACÓN.

1. RESUMEN

Los fructanos son el principal carbohidrato de reserva en los tubérculos de yacón (*Smallanthus sonchifolius*) y se asocian a la tolerancia al estrés en las plantas. Estos azúcares varían en contenido y distribución durante el desarrollo del cultivo, lo que hace importante conocer su metabolismo y las enzimas que regulan su síntesis y degradación. Una de las enzimas clave es la fructano exohidrolasa (FEH), que suministra rápidamente carbohidratos cuando la planta necesita energía. El objetivo principal de este estudio fue caracterizar y purificar la 1-FEH de yacón para evaluar su función bioquímica. La actividad 1-FEH fue determinada en las raíces desde el sexto hasta el duodécimo mes de crecimiento, observando un aumento en su actividad tras una helada en el octavo mes, lo que evidenció el uso de los FOS para el rebrote. El extracto crudo de la enzima se obtuvo homogenizando porciones de raíces en buffer Mc Ilvaine 50mM (1:1 w/v), pH 5.5 seguido de filtración, centrifugación y desalinizado por diálisis. El extracto crudo mostró actividad en un rango de pH de 5-6, con temperatura óptima a 30 °C y máxima actividad a 50 mg/ml. Se determinó que la actividad máxima se alcanzaba tras 6 horas de incubación con inulina. Para purificar la enzima, el extracto crudo se concentró por ultrafiltración y se precipitó de manera fraccionada con sulfato de amonio (20-80%). El sobrenadante recuperado y dializado fue sometido a dos protocolos combinando cromatografía de afinidad, de intercambio aniónico y de exclusión molecular. La purificación fue parcial, obteniéndose varias fracciones con actividad FEH. En la electroforesis se identificaron bandas con pesos de 71.9, 55.2 y 26.2 kDa en el primer protocolo, y 52.03 y 24.09 kDa en el segundo. La enzima parcialmente purificada mostró mayor especificidad por fructanos de cadenas cortas (kestosa, nistosa) que por los de cadenas largas (inulina).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

- Caracterizar y purificar la enzima fructano exohidrolasa (FEH) a partir de raíces tuberosas de yacón.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar la actividad fructano exohidrolasa (FEH) durante la maduración de las raíces de yacón en un periodo de cultivo.
- Determinar el pH, temperatura y tiempo de reacción óptimos para evaluar la actividad FEH en el extracto crudo de raíces de yacón.
- Desarrollar un protocolo de extracción para obtener extractos concentrados de la enzima.
- Desarrollar un protocolo de purificación utilizando columnas de cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de afinidad y cromatografía de exclusión molecular.

3. MARCO TEÓRICO

Del 12 al 15% de angiospermas sintetizan fructano como su fuente principal de carbohidratos en lugar de almidón. Los fructanos se encuentran ampliamente distribuidos entre las familias: Liliaceae, Asteraceae, Campanulaceae, Boraginaceae, Triticeae, y Asparagaceae; cuyas plantas acumulan los productos de asimilación fotosintética en las vacuolas en forma de fructanos en lugar de almidón como estrategia de adaptación a su hábitat (Yoshida, 2021).

Las hidrolasas glucosídicas son enzimas que se dividen en más de 100 familias según su estructura general. La familia 32 de las enzimas hidrolasas glucosídicas (GH-32) en plantas incluye diferentes hidrolasas como las invertasas de la pared celular, exohidrolasas fructosílicas e invertasas vacuolares y fructosiltransferasas, entre otras. (Lothier *et al.*, 2014; Cimini *et al.*, 2016 citados por Gonzalez-Díaz *et al.*, 2020).

3.1. La enzima fructano exohidrolasa (FEH) y la movilización de fructanos

Esta enzima está especializada en la degradación de los fructanos mediante la liberación de monómeros de fructosa del final de la cadena. Dichos monómeros se usan para el suministro constante de energía en la supervivencia durante el invierno y el rápido suministro de azúcar para la regeneración o la brotación de los tejidos en primavera (Ritsema & Smeekens, 2003; Yoshida, 2021). La FEH no actúa sobre el enlace glucosídico de la sacarosa, siendo la fructosa y sacarosa los principales productos de su acción (Edelman y Jefford, 1968).

Dependiendo del tipo de enlace entre los residuos de fructosa que es hidrolizada, se puede distinguir la 1-FEH, que hidroliza enlaces $\beta(2-1)$ de inulina, la 6-FEH, que hidroliza enlaces $\beta(2-6)$ de levano y enzimas FEH que hidrolizan ambos enlaces (Livingston *et al.*, 2009; Ritsema & Smeekens, 2003).

Las especies que soportan bajas temperaturas y cobertura de nieve como los cereales y pastos de invierno acumulan fructanos como respuesta al frío y su concentración decrece cuando la planta está cubierta de nieve. El consumo de fructanos durante la cobertura de nieve permite incrementar la tolerancia al congelamiento y está directamente relacionada a la expresión de la FEH (Meguro-Maoka y Yoshida, 2016). La humedad y oscuridad de las nevadas permiten a los mohos de nieve infectar los tejidos vegetales sin embargo, la acumulación de fructanos durante la aclimatación y su consumo durante la cobertura de

nieve ha sido relacionada a la actividad de las FEH en cultivos resistentes a los mohos (Meguro-Maoka y Yoshida, 2016). En el cultivo de trigo, se ha reportado que las FEH participan en la movilización de fructanos almacenados en el tallo hacia las semillas bajo condiciones de sequía (Zhang *et al.*, 2015). Estas enzimas también liberan la fructosa almacenada para estimular el crecimiento de hojas nuevas.

Además de la degradación y movilización de fructanos, las FEHs pueden estar presentes también durante la síntesis (Lothier *et al.*, 2007; Meguro-Maoka y Yoshida, 2016). Se ha reportado una alta expresión FEH durante la síntesis de fructanos actuando en conjunto con las enzimas de síntesis en el corte de enlaces β -1,2 para generar fructanos de bajo grado de polimerización. Estos fructanos contribuyen a mantener un potencial osmótico bajo que permite el transporte agua durante el crecimiento celular (Lothier *et al.*, 2007). Los fructanos de bajo grado de polimerización se insertan en el grupo lipídico de las membranas, lo que las estabiliza e impide fugas cuando el agua es removida durante las heladas o sequías (Livingston *et al.*, 2009). El mecanismo de recorte de enlaces β -1,2 por parte de las FEH podría explicar por qué en los fructanos de bajo grado de polimerización predomina el enlace β -1,2 mientras que en los fructanos de alto grado de polimerización predomina el enlace β -2,6 (Livingston *et al.*, 2009). Asimismo, se ha reportado que la expresión de FEH está relacionada con la regulación de la acumulación de carbohidratos hidrosolubles durante en otoño y principios del invierno en cereales como el trigo (Meguro-Maoka & Yoshida, 2016)

El grado de polimerización de los fructanos varía según la especie o época del año. La achicoria tiene el promedio más alto (GP = 30) mientras que el trigo tiene el promedio más bajo (GP = 4.4 – 7.3) (Van Loo, 2007; Ribeiro *et al.*, 2022). En el caso del yacón, el grado de polimerización observado varía en un rango de 3 a 7 (Contado *et al.*, 2015). La gran diversidad de GP en estas especies nos indica la complejidad del metabolismo de

fructanos en las plantas. Comúnmente los fructanos son sintetizados por fructosiltransferasas, incluyendo 1-SST, 1-FFT, 6-SST/6-SFT y 6G-FFT y son degradadas por fructano exohidrolasas (FEH) (Shi *et al.*, 2023). Sin embargo, no todas las familias de plantas que producen fructanos presentan fructano exohidrolasas pero sí presentan invertasas con actividad hidrolítica en fructanos. Además del yacón (Narai-Kanayama *et al.*, 2007), se ha reportado actividad FEH en *Vernonia herbacea* (Asega *et al.*, 2011) *Lolium perenne* L. (Gasperl *et al.*, 2015), *Triticum aestivum* L. (Meguro-Maoka y Yoshida, 2016), *Cichorium intybus* (Lammens *et al.*, 2009; Yoshida, 2021), *H. vulgare*, *D. glomerata* (Bonnett & Simpson, 1993), y en espárragos (Yoshida, 2021), entre otros.

3.2. Regulación de la actividad 1-FEH en plantas productoras de fructanos

Se estima que las enzimas involucradas en el metabolismo de los fructanos están reguladas transcripcionalmente, sin embargo, el mecanismo de transcripción no está claro aún (Shi *et al.*, 2023). Los efectores endógenos y exógenos para la inducción de estos genes son aún desconocidos. Lo que se conoce es que los azúcares, hormonas y diferentes tipos de estrés regulan estos genes en las plantas que acumulan fructanos. (Van den Ende *et al.*, 2002). Wei *et al.* (2017) han identificado tres factores de transcripción R2R3-MYB (CiMYB17, CiMYB3, CiMYB5) que regulan la expresión de los genes del metabolismo de los fructanos en *C.intybus*. CiMYB17 activa los promotores de los genes 1-SST, 1-FFT y 1-FEH, mientras que CiMYB5 y CiMYB3 regulan los genes 1-FEH en respuesta al estrés abiótico y a señales hormonales. Posteriormente Fan *et al.* (2022) confirmaron la presencia de los tres factores de transcripción en yacón. Esta aparente contradicción de la doble función en el control de las vías de síntesis y degradación de fructanos se puede explicar teniendo en cuenta que las FEHs podrían estar involucradas en la hidrólisis de los fructanos durante la acumulación de éstos, como un mecanismo que contribuiría a determinar el patrón de fructanos y el grado final de polimerización en cada especie.

Los cambios en la actividad FEH durante periodos de acumulación o de pérdida de fructanos han sido demostrados en diferentes especies de plantas, entre ellas: *H. tuberosum* (Edelmann y Jefford, 1968) *H. vulgare* (Wagner *et al.*, 1986); *D. glomerata* (Yamamoto & Mino, 1987); *L. temulentum* (Simpson *et al.*, 1991); *L. rigidum* (Smouter y Simpson, 1991; Pavis *et al.*, 2001); *P. sonchifolia* (Fukai *et al.*, 1997; Itaya *et al.*, 2002). Las actividades FEH de *H. tuberosus*, *L. temulentum*, *L. rigidum*, *C. intybus* *V. herbacea* y *T. aestivum* han demostrado ser inhibidas por sacarosa a concentraciones de 10-20mM. (Edelmann y Jefford 1964; Simpson *et al.*, 1991; Bonett y Simpson 1995; Asega *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2015). Sin embargo, la sacarosa, glucosa y fructosa (a 25mM) se reportaron como no inhibidores de FEH en las hojas de *H. vulgare* (Wagner & Wiemken, 1986).

Si bien los fructanos se acumulan a través de las enzimas de síntesis durante el crecimiento de las plantas y también bajo condiciones de estrés como en heladas y deficiencia de nitrógeno (Livingston y Henson, 1998, Wang *et al.*, 2000; Livingston *et al.* 2009), el aumento en la actividad de FEH en los órganos subterráneos de reserva se puede relacionar con el brote de los órganos aéreos como el caso de *C. intybus* (Van den Ende *et al.* 1996) y *H. tuberosus* (Marx *et al.*, 1997a). También ha sido notorio el incremento de la actividad 1-FEH durante el rebrote inducido en plantas de yacón después de la pérdida de los órganos aéreos, (Fukai *et al.*, 1997). Estudios preliminares realizados durante el ciclo fenológico de *V. herbacea* mostraron que la FEH presenta actividad elevada en el rebrote y que la actividad de FEH en los rizóforos de *V. herbacea* también puede ser inducida en la poda y rebrote de las ramas aéreas y cuando son sometidas a bajas temperaturas. (Carvalho y Dietrich, citados por Asega *et al.*, 2004). Asimismo, Van den Ende y Van Laere (1996), observaron que el frío inducía las isoformas 1-FEH I y 1-FEH II en *C. intybus* sin embargo, no estaba claro qué isoforma era inducida en qué fase

concreta, ya que no fue posible distinguir entre las actividades 1-FEH I y 1-FEH II en extractos crudos.

Morvan *et al.* (1997), observaron que la actividad exohidrolasa también se incrementa después de la defoliación en *Lolium perenne*. Esta inducción pudo ser prevenida por uniconazol, un inhibidor de la biosíntesis de ácido giberélico y este efecto puede ser contrarrestado con la reposición del mismo. Esta observación sugiere que las giberelinas podrían influir en la degradación de fructanos vía la inducción de la actividad FEH. También han sido observadas variaciones en las actividades de las enzimas de síntesis y degradación de fructanos en plantas jóvenes desfoliadas de *C. intybus* que además del aumento de la actividad FEH, mostraron disminución de la actividad de SST y variaciones en la actividad de FFT durante todo el período experimental (De Roover *et al.*, 1999b). Van den Ende *et al.* (1999), probando diferentes concentraciones de nitrógeno en el medio de crecimiento de plántulas de *C. intybus* comprobaron también efectos drásticos en el metabolismo de los fructanos y una dirección opuesta en los tenores de la 1-SST con respecto a la 1-FEH.

3.3. Purificación de la FEH

Las características que se describen sobre las FEH purificadas y sus variantes de actividad mayormente son derivadas de estudios que utilizan enzimas sólo parcialmente purificadas. Muchos de estos trabajos separan todas las enzimas del metabolismo de los fructanos y miden sus actividades individuales en extractos crudos que contienen cantidades variables de cada proteína, y se sabe que este valor es dependiente del estado fenológico de la planta.

Las enzimas FEH parcialmente purificadas de plantas asteráceas mayormente no exhiben actividad hidrolítica sobre sacarosa (Degasperi *et al.*, 2003; Asega *et al.*, 2008; Van den

Ende *et al.*, 2009). Las FEHs son formas evolucionadas a partir de invertasas de pared celular que llegaron a ser capaces de utilizar oligo- y polifruktanos como sustrato donante, de esta manera, los hallazgos de β -fructosidasas vegetales que pueden utilizar tanto sacarosa o fructanos como sustratos donantes podrían considerarse una especie de intermediario evolutivo entre las invertasas y las FEH (Van den Ende *et al.*, 2002)

La 1-FEH ha sido purificada y caracterizada a partir de varias especies vegetales. En *C. intybus* se ha obtenido una inulinasa purificada por Claessens *et al.* (1990) mas dos isoformas 1-FEH IIa y 1-FEH IIb por Van den Ende *et al.* (2001). En *H. tuberosus*, una 1-FEH purificada (Marx *et al.*, 1997a), dos isoformas Ht1-FEH I y Ht1-FEH II (Xu *et al.*, 2015) y una tercera Ht1-FEH III (Zhan *et al.*, 2018). Se obtuvo una 6-FEH purificada de *Lolium perenne* (Marx *et al.*, 1997b), una FEH purificada de *Avena sativa* que hidroliza preferentemente enlaces β -2,6 (Henson y Livingston, 1996) , una FEH de *H. vulgare* que es capaz de hidrolizar tanto enlaces β -2,1 como β -2,6 (Henson y Livingston, 1998) y dos isoformas de hidrolasas 1-FEH en *Arctium lappa* (Ueno *et al.*, 2015). Así también, Ueno *et al.* (2018), desarrollaron la purificación y caracterización de una FEH de espárrago, y el análisis funcional de su gen. La enzima purificada existía como un dímero consistente en dos polipéptidos con una masa molecular de aproximadamente 68 kDa. Las enzimas nativas obtenidas de raíces de espárrago y las enzimas recombinantes producidas por *Pichia pastoris* en este trabajo, mostraron actividad 1-FEH mediante la hidrólisis de fructanos de tipo inulina, pero a diferencia de otras 1-FEHs, estas enzimas mostraron una mínima hidrólisis de la 1-kestosa, mientras hidrolizaron eficazmente la neokestosa. Por lo tanto, la enzima se denominó 6G&1-FEH.

Se ha reportado el uso de la cromatografía de interacción hidrofóbica en avena para la purificación de las enzimas del metabolismo de fructanos utilizando las fracciones con actividad FEH obtenidas de una comatografía previa de intercambio aniónico Mono Q

(Henson & Livingston, 1996). Se utilizó una columna metil-HIC (Bio-Rad) calibrada con una saturación de sulfato de amonio de 2.4M, se eluyó la enzima con un gradiente lineal de sulfato de amonio hasta 0 M de concentración en el buffer. Se obtuvieron fracciones con actividad β -2-6 fructano hidrolasa.

En un trabajo de purificación de la enzima sacarosa-sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST) de *Helianthus tuberosus*, otra glicoproteína del metabolismo de fructanos, se utilizó una columna de interacción hidrofóbica de Fenil Sefarosa de Alta Resolución, esta enzima fue eluida con una gradiente lineal paralela, de buffer sin sulfato de amonio y de 0 a 25% de 2-etoxietanol, recuperando una gran actividad enzimática. (Koops y Jonker, 1996).

Existe relativamente un menor número de reportes sobre FEHs en pastos. Un nivel alto de pureza fue logrado con la FEH de pseudo tallos de *D. glomerata* (Yamamoto y Mino, 1989). Aunque la electroforesis 2-D no fue probada, esta enzima al ser teñida por amido black mostró una sola banda después de realizar el gel de electroforesis. En *Lolium temulenium*, dos isoformas de FEH fueron observadas luego de ejecutar cambios en el metabolismo de los carbohidratos las plantas y medir la actividad hidrolítica que visualizaron en un gel de electroforesis de almidón (Simpson *et al.*, 1991) y en *Lolium rigidum*, dos isoformas de FEH fueron separadas en un protocolo de purificación que incluyó enfoque isoelectrico. El punto isoelectrico (pI) para las dos isoformas de FEH fue de 4.5 y 4.8 respectivamente (Bonnett y Simpson, 1993).

En *T. officinale* Rutherford y Deacon (1972), lograron separar dos isoformas FEH que exhibieron pH óptimos similares (4.0), K_m y actividades similares con varios sustratos tipo inulina, aunque mostraron diferente comportamiento en la cromatografía de intercambio aniónico DEAE. De otro lado, en *H. tuberosus* con dos isoformas extraídas, una exhibió una ligera disminución del pH óptimo, mejor estabilidad de calor y hasta un 33% de altas tasas de hidrólisis con oligosacáridos DP3-6 (Edelman y Jefford, 1964).

Respecto a las características bioquímicas de la enzima , en *C. intybus* se determinó un pH cercano a 5.5 para la máxima actividad 1-FEH y una temperatura óptima de acción a los 35 °C (De Roover *et al.*, 1999a) El pH de máxima actividad para la 1-FEH parcialmente purificada ha sido variable en los diferentes reportes así como la temperatura óptima . Se obtuvo máxima actividad de la 1-FEH a pH en el rango de 5.5-6.0 pero este valor fue menor para la actividad 1-FEH en extracto crudo . Asimismo, las temperaturas de ensayo óptimo para enzimas 1-FEH parcialmente purificadas fueron reportadas entre 30 y 40 °C y para preparaciones crudas de FEH, entre 25 y 35 °C (Simpson y Bonnett, 1993).

4. METODOLOGÍA

Este trabajo de investigación se desarrolló en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina y en el Laboratorio de Virología y de Entomología Molecular del Centro Internacional de la Papa (CIP).

4.1. Material vegetal

Para la determinación de la actividad enzimática se utilizaron raíces tuberosas de yacón de la accesión AMM 5163 dado que fue la accesión que mostró sostenidamente un buen contenido de FOS durante la etapa de crecimiento evaluada, así como un buen rendimiento en raíces. Las raíces tuberosas fueron cosechadas desde el sexto hasta los doce meses de crecimiento. Para la purificación de la FEH se utilizaron raíces maduras de la misma accesión.

4.2. Extracción enzimática

Se tomaron mensualmente muestras de raíces tuberosas que fueron lavadas, peladas, cortadas y homogenizadas en Buffer Mc Ilvaine 50mM (1:1 w/v), pH 5.5 con 5 mM de

ácido ascórbico, 5% PVPP (w/w), 2mM de β -mercaptoetanol y 0.02% de azida de sodio (w/v). El homogenizado fue mantenido en reposo a 4°C por 2h y luego filtrado por dos capas de nylon. El extracto fue centrifugado a 10500 r.p.m. por 30min. El sobrenadante fue llevado a desalinizar mediante la diálisis en el mismo buffer por 24 horas. Para los ensayos enzimáticos y de caracterización se utilizaron 50g de tejido para la homogenización. Para la purificación de la enzima se partió de homogenizados obtenidos de 1k de raíces.

4.3. Evaluación de la actividad enzimática

La actividad enzimática fue medida a partir de la incubación de extracto enzimático y solución de sustrato en proporción 1:1 (v/v). Para el análisis de actividad de $\beta(2-1)$ FEH, se utilizó inulina de *Dahlia* sp de Sigma-Aldrich (fructanos con un grado de polimerización aproximado de 35) al 5% preparado en buffer citrato-fosfato 50mM, pH 5.5 con un tiempo de incubación de 6 horas en baño María a 30°C. Para detener la reacción de las muestras, se llevaron a ebullición por 5 min. La actividad enzimática se determinó a través de la cuantificación de azúcares reductores por el método Somogyi-Nelson (Nelson, 1944). Una unidad (U) de actividad enzimática corresponde a la cantidad de enzima que libera una μ mol de fructosa por minuto por mililitro de reacción. Se elaboró previamente una curva de calibración de fructosa en las concentraciones de 0.05-5.00 mg/mL.

4.4. Determinación de contenido de proteína

La concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford (1976), de acuerdo al método descrito en el Capítulo 1 (4.4.5)

4.5. Purificación de la FEH

4.5.1. Extracción y ensayo enzimático

La extracción de la enzima a partir de raíces tuberosas de yacón (1 kg) fue realizada siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.2, con la diferencia de que en esta etapa el sobrenadante fue filtrado nuevamente con filtros Whatman N° 42 y Millipore (0.45µm) para llevarlo a ultrafiltración con el propósito de concentrar las proteínas. Todos los procedimientos fueron llevados a cabo a 4°C.

Durante las diferentes etapas de purificación, la actividad enzimática fue medida a partir de la incubación de un sustrato con un extracto enzimático en proporción 1:1 (v/v). La determinación de actividad de la FEH se llevó a cabo según el procedimiento descrito en la sección 4.3. Asimismo, con los datos del contenido proteico del extracto enzimático, se determinó la actividad específica de la enzima (U/mg de proteína) para comparar la pureza o eficiencia alcanzada en las diferentes etapas de purificación a realizar.

4.5.2. Caracterización de la FEH en extracto crudo

La caracterización de la actividad hidrolasa fue realizada utilizando extracto enzimático crudo e inulina 5% de *Dahlia* sp. como sustrato. La curva de tiempo fue obtenida por incubación a los 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 7 y 8 horas a 30°C. El pH óptimo fue determinado entre valores de 3.5, y 7.5 a 30°C según lo reportado en la literatura y la temperatura óptima de incubación fue determinada a través de ensayos realizados entre 0 y 60°C. La curva de concentración de sustrato fue determinada por incubación con inulina en concentraciones de 1 a 8%, a 30°C.

4.5.3. Concentración del extracto crudo

Este proceso se utilizó para concentrar el volumen del extracto crudo y obtener con ello un mayor contenido proteico para las etapas de purificación. Se utilizaron dos métodos de concentración: ultrafiltración y liofilización, los cuales fueron realizados después

obtener el extracto a partir de las raíces tuberosas. Para la ultrafiltración se utilizó una membrana en sistema cassette de Millipore (Pellicon XL50 Ultrafiltration Module Ultracel 10 kDa 0.005 m²) asociado a una bomba peristáltica para el flujo de entrada y salida del extracto. Para el adecuado uso de esta membrana, el extracto tuvo que pasar por una filtración previa. La liofilización fue realizada con un equipo Labconco, los extractos de yacón fueron precongelados por 4 horas y luego llevados a liofilización por 15 horas. El criterio para la elección del mejor método de concentración fue el de mayor rendimiento proteico y mayor actividad FEH.

4.5.4. Precipitación proteica

Para iniciar la purificación de la FEH de yacón se utilizó el método de precipitación proteica para conseguir un extracto enzimático concentrado y libre de los demás componentes de la raíz tuberosa. Se eligió el uso de sulfato de amonio por ser el más recomendado en estudios similares. Como etapa preliminar se probaron diferentes concentraciones, únicas (60%) y fraccionadas (20-70%, 20-80%, 45-90%, 30-80%) aplicadas al extracto crudo sin concentrar en condiciones de refrigeración y agitación leve constante. Luego de la diálisis y la determinación de la actividad enzimática, se eligió la concentración que lograra el mayor rendimiento proteico y la mayor actividad específica de la enzima.

Obtenida la concentración de sulfato de amonio adecuada, (20-80%), se aplicó al extracto ultrafiltrado de la manera siguiente. Se añadió (NH₄)₂SO₄ a una saturación de 20%, y se agitó lentamente en hielo por 1 hora, dejándolo reposar toda la noche a 4°C. Después se centrifugó a 12000 g por 20 min y el precipitado se eliminó. El sobrenadante fue llevado a una saturación de 80% de (NH₄)₂SO₄ agitando lentamente en hielo por 1h seguido de un reposo de toda la noche. Después de una centrifugación a 12000 g por 20min a 4°C, el precipitado fue re-suspendido en buffer de citrato-fosfato 50mM pH 5.5, conteniendo

1mM de cloruro de manganeso, 1mM de cloruro de calcio y dializado contra el mismo buffer por 12h en agitación. A este extracto se le denominó extracto crudo en las etapas de purificación. Todos los procedimientos fueron llevados a cabo a 4°C.

4.5.5. Cromatografías de Purificación

Cromatografía de intercambio aniónico. Las fracciones que mostraron actividad hidrolítica se ajustaron a pH 7 y se aplicaron a una columna de intercambio aniónico Macroprep High Q (BioRad), la cual fue equilibrada con buffer 20mM Tris-HCl pH 7. Las proteínas fueron eluidas usando un gradiente discontinuo de 0.25, 0.35, 0.5 y 1M de cloruro de sodio con un flujo de 0.5 mL min⁻¹ en el mismo buffer. Las fracciones activas fueron colectadas y almacenadas a -20°C.

Cromatografía de afinidad. Se utilizó una columna (1.2 x 6 cm) de Concanavalina A (Con A) Agarosa (GBiociences), equilibrada con 50mM buffer citrato-fosfato 50mM pH 5.5, conteniendo 1mM de cloruro de manganeso, 1mM de cloruro de calcio. El extracto fue aplicado a esta columna con un flujo de 0.5 mL min⁻¹, después de lavar la columna con cinco volúmenes del mismo tampón, las proteínas ligadas fueron eluidas con 0.25M metil α D-manopiranosido, 50% etilenglicol, 1M cloruro de sodio en buffer citrato fosfato 50mM, pH 5.5.

Cromatografía de exclusión molecular (filtración en gel). Las fracciones con actividad fueron aplicadas en una columna (0.75 x 57 cm) Superdex 75 prep grade (GE Healthcare Life Sciences) que fue equilibrada en buffer 10mM citrato-fosfato pH 5.5 y 0.2M cloruro de sodio. Las proteínas fueron eluidas en el mismo buffer con un flujo de 0.3 mL min⁻¹. También se utilizó una columna de Sephadex LH-20 (Sigma, St. Louis, MO).

4.5.6. Electroforesis

El análisis cualitativo de las proteínas fue efectuado a través de electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS-PAGE), empleándose un sistema discontinuo. Se utilizaron geles al 10% de poliacrilamida en buffer Tris 0.025M, glicina 0.192M, pH 8.3, conteniendo 0.1% dodecil sulfato de sodio (SDS). Como marcadores de masa molecular fueron utilizados fosforilasa b (97.4 kDa), albúmina sérica bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), inhibidor de tripsina (21.5 kDa) y lisozima (14.4 kDa). Los geles fueron colocados en una solución de tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250 por una hora y posteriormente se colocaron en una solución de desteñido, cambiando la solución cada media hora hasta que las bandas fueron suficientemente nítidas.

4.5.7. Especificidad de la FEH parcialmente purificada

El estudio de especificidad se realizó utilizando un extracto enzimático parcialmente purificado de yacón con sustratos de diferentes grados de polimerización (GP) y con enlaces $\beta(2-1)$: sacarosa (200mM), 1-kestosa (200mM), nistosa (200mM), e inulina al 5%. Los sustratos se prepararon en buffer citrato-fosfato 50mM, pH 5.5.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. Actividad enzimática de la FEH durante un periodo de crecimiento del yacón

La Figura 2.1 muestra el análisis por HPLC de la actividad específica de la fructano exohidrolasa desde el sexto mes hasta los doce meses de crecimiento en las raíces tuberosas de plantas de yacón. Estos valores corresponden a la actividad de la enzima utilizando kestosa como sustrato.

La actividad específica FEH fue detectada durante todo el período de evaluación. Al sexto mes se observaron valores bajos en actividad hidrolítica. Un ligero incremento ocurrió en

el noveno mes de crecimiento (primer mes del rebrote), hasta alcanzar un valor máximo de 20.33 U/mg en el onceavo mes (tercer mes del rebrote después de la helada). Estos valores permanecieron medianamente altos hasta la última cosecha realizada, lo cual sugiere que el follaje del rebrote aun dependía de los fotosintatos provenientes de la planta al cuarto mes del rebrote con la actividad de la FEH sobre los FOS de la corona.

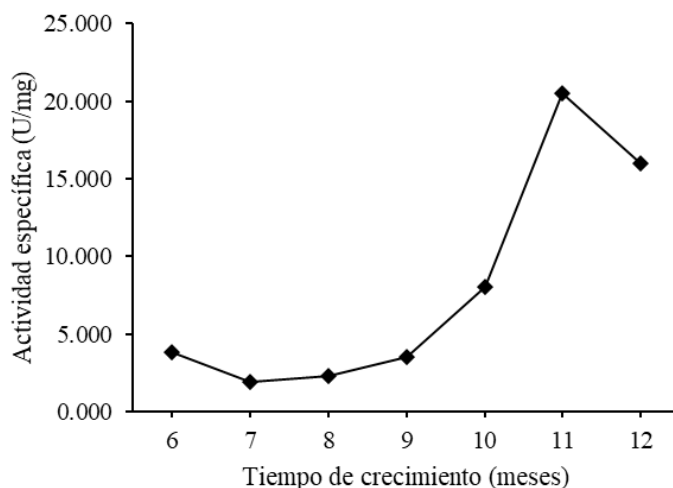


Figura 2.1. Actividad específica (U/mg) de la FEH en extracto crudo de raíces de yacón de la accesión AMM 5163 analizado por HPLC con sustrato kestosa.

En la Figura 2.2 se presentan los resultados de actividad específica FEH para el mismo periodo de evaluación utilizando inulina como sustrato. Al séptimo mes de crecimiento no se observa actividad FEH aparente, a partir del octavo mes en adelante, se incrementó hasta alcanzar un máximo de 2.65 U/mg en el último mes de cultivo. Este valor fue notoriamente mas bajo que el alcanzado con el sustrato kestosa.

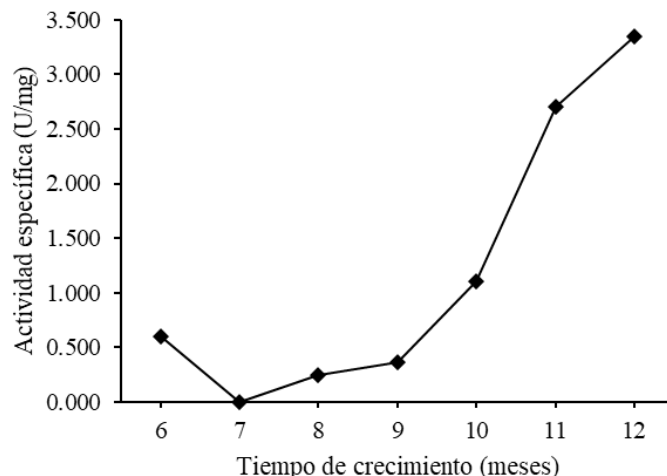


Figura 2.2. Actividad específica (U/mg) FEH utilizando Inulina como sustrato en método colorimétrico.

Si bien pudo observarse un patrón similar de actividad FEH con ambos métodos, el comparativo de actividades FEH para kestosa e inulina podría ser más concluyente en condiciones de crecimiento normales del cultivo y no afectado por una helada como en este estudio. Sin embargo, Itaya *et al.* (2002), en una campaña de cultivo sin heladas analizaron la actividad exohidrolasa en raíces de yacón con kestosa, nistosa e inulina como sustratos y obtuvieron actividad hidrolítica FEH desde el tercer mes de crecimiento sobre kestosa y nistosa y desde el quinto mes también sobre inulina con un incremento al séptimo mes sobre los tres sustratos que se mantuvo hasta el fin del cultivo. Ellos observaron una actividad FEH mayor con nistosa como sustrato.

Los resultados de actividad específica que se obtuvieron al octavo mes (pérdida de follaje por la helada) fueron de 3.276 U/mg para kestosa y 0.25 U/mg para inulina. Estos valores fueron mayores a los reportados por Fukai *et al.* (1997), quienes obtuvieron aproximadamente 0.15 U/mg de actividad específica FEH con la consiguiente disminución de fructanos en las raíces tuberosas y la corona en el mes donde las partes áreas de la planta sufrieron daño físico debido a los vientos fuertes de un tifón. De acuerdo

a Fukai *et al.* (1997) se puede asumir que el yacón induce la actividad FEH en la utilización de los fructanos para mantener su crecimiento cuando el suministro de fotosintatos es insuficiente durante el periodo de crecimiento.

5.2. Caracterización de la FEH en extracto crudo

La actividad óptima se obtuvo a pH 5.5 para el sustrato inulina (Figura 2.3A), pero se observó una actividad casi constante entre pH 5 – 6. Se realizó la misma prueba con sustrato Kestosa (Figura 2.3A), donde la actividad fue relativamente alta en casi todo el rango de pH evaluado. Henson y Livingston (1996), obtuvieron una actividad máxima en pH 4.5 a 5 de una 6-FEH purificada de avena empleando como sustrato neokestina (un fructano β -2,6). Van den Ende *et al.* (2003), obtuvieron el mismo resultado respecto al pH que los dos autores antes mencionados, con las dos isofomas de 1-FEH purificadas de trigo, además de ser inactivadas a pH por encima de 7.5. Degasperi *et al.* (2003), por su parte, obtuvieron un pH óptimo de 5.4 utilizando una fracción semipurificada de FEH en *Viguiera discolor*.

La temperatura óptima para la actividad FEH se obtuvo a los 30°C (Figura 2.3B). Van den Ende *et al.* (2003), también reportaron actividades óptimas entre 30°C y 40°C. Similares resultados se encontraron en estudios para la 1-FEH de la alcachofa de Jerusalén (Marx *et al.*, 1997a); la 1-FEH de cebada (Henson, 1989, citado por Van den Ende *et al.*, 2003) y la 6-FEH de ryegrass (Degasperi *et al.*, 2003), en donde obtuvieron un rango óptimo de temperatura entre 20 y 40°C.

Respecto a la concentración del sustrato inulina empleada en la medida de la actividad enzimática (Figura 2.3C) se encontró un incremento de actividad a partir del 10 mg.ml⁻¹ de inulina, llegando al óptimo a una concentración de 50 mg.ml⁻¹ (5%). Itaya *et al.* (2002) utilizaron 5% de inulina de *H. tuberosum* para medir la actividad FEH en rizóforos y

raíces de yacón mientras Van den Ende *et al.* (2003) utilizaron 3% de inulina para medir la actividad de dos isoformas FEH en trigo sin destacar que sea la óptima concentración para poder alcanzar la máxima actividad de las enzimas.

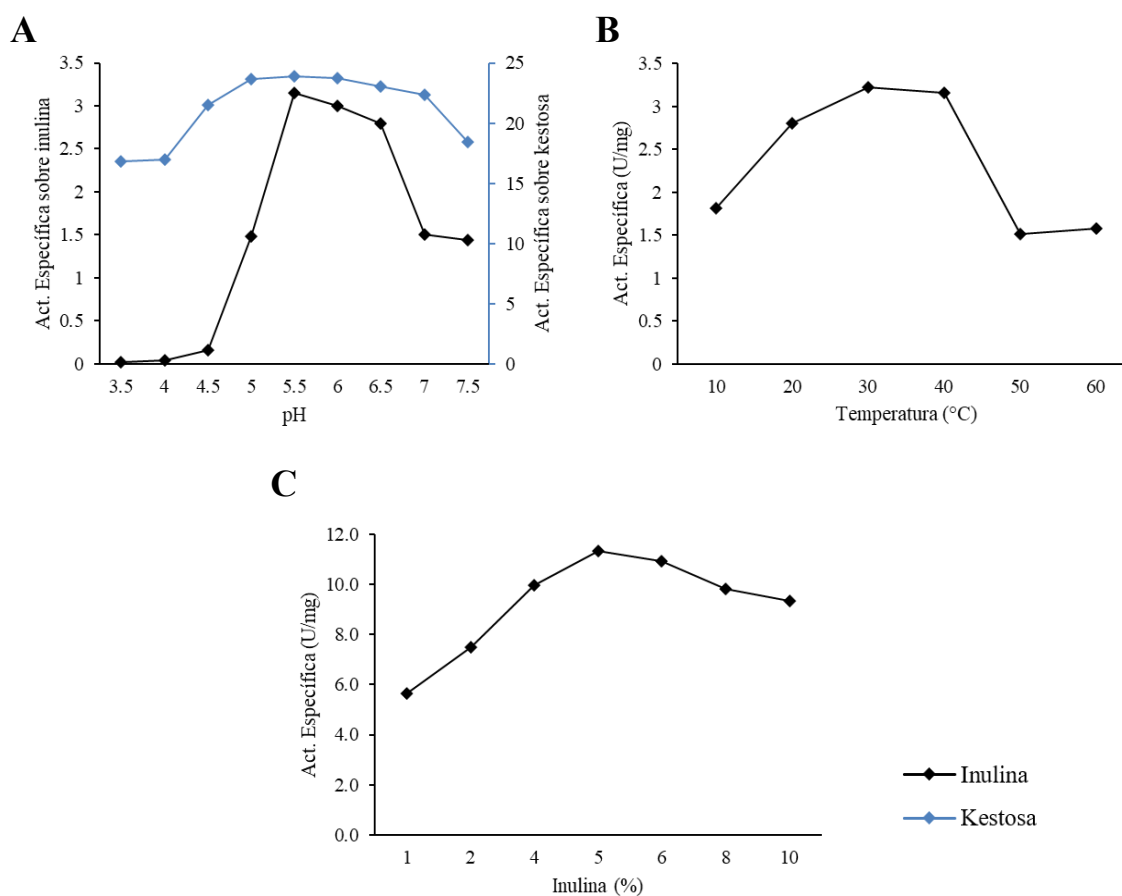


Figura 2.3. Caracterización de la FEH en extracto crudo **(A)** Actividad específica en el rango de pH 3.5 – 7.5 sobre sustrato inulina y kestosa **(B)** Actividad específica en el rango de 10 °C – 60 °C sobre sustrato inulina **(C)** Actividad específica a diferentes concentraciones de sustrato inulina (1 – 10 %)

La curva de tiempo se obtuvo por incubación a 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 7, 8 horas; donde se observó la mayor actividad entre las 6 y 8 horas de incubación (datos no mostrados).

5.3. Concentración del extracto crudo

Se puede observar en la Tabla 2.1, los resultados con la liofilización, este método permite concentrar la solución con todas las sales presentes en el extracto inicial removiendo sólo el líquido al vacío. Se obtuvo un bajo rendimiento (12.82%) con respecto al extracto inicial, si bien la concentración de proteína (mg/mL) aumentó 3.5 veces en el liofilizado la actividad específica disminuyó en 75% respecto al extracto crudo.

El método de ultrafiltración, a diferencia de la liofilización, concentra una solución proteica por la remoción de moléculas pequeñas a través de una membrana semipermeable que no permite el paso de las moléculas de mayor tamaño. En la Tabla 2.2, se observa que con la ultrafiltración se obtuvo un mejor rendimiento (40.27%) debido a una mayor actividad total recuperada, aunque la concentración de proteína (mg/mL) fue menor que con la liofilización (1.5 veces). Por otro lado, la actividad específica se conservó en un 86%.

Con estos resultados, se eligió la ultrafiltración como método de concentración inicial de la proteína para la purificación.

Tabla 2.1. Rendimiento proteico y actividad enzimática del extracto de yacón concentrado mediante liofilización.

Etapa de purificación	Volumen	Proteína	Proteína total	Actividad	Act. específica	Actividad total	Rendimiento
	ml	mg/ml	mg	U/ml	U/mg	U	
Extracto crudo	1200	0.132	158.4	2.27	17.197	2724	100
Liofilizado	175	0.462	80.85	1.996	4.32	349.3	12.823

Tabla 2.2 Rendimiento proteico y actividad enzimática del extracto de yacón concentrado mediante ultrafiltración.

Etapa de purificación	Volumen	Proteína	Proteína total	Actividad	Act. específica	Actividad total	Rendimiento
	ml	mg/ml	mg	U/ml	U/mg	U	
Extracto crudo	1500	0.1975	296.25	0.385	1.949	577.35	100
UF	465	0.295	137.18	0.5	1.695	232.5	40.27

Tabla 2.3. Comparativo del rendimiento proteico y actividad enzimática de dos extractos de yacón concentrados por ultrafiltración y por liofilización.

Etapa de purificación	Volumen	Proteína	Proteína total	Actividad	Act. específica	Actividad total	Rendimiento
	ml	mg/ml	mg	U/ml	U/mg	U	
Ultrafiltrado	10	0.569	5.69	10.41	18.295	104.1	100
UF + Liofilizado	2	1.1899	2.3798	9.52	8.001	19.04	18.29

Se realizaron otras pruebas de concentración del extracto después del método de ultrafiltración para obtener un volumen proteico concentrado. Se utilizó nuevamente la liofilización, después de ultrafiltrar el extracto y se observó en varias oportunidades que la actividad enzimática siempre disminuía cuando el extracto pasaba de un estado ultrafiltrado a liofilizado. En la Tabla 2.3 se observa un rendimiento del 18.3% del liofilizado con una pérdida significativa de actividad específica y de proteína total. De esta manera se descartó la utilización del método de liofilización en la etapa inicial de purificación enzimática, Al respecto Scopes (1993), afirma que la liofilización puede causar pérdidas de la actividad enzimática, por lo que se recomienda el uso de polioles como aditivos, e incluso trehalosa para mantener la estabilidad de la proteína durante el proceso.

5.4. Precipitación Proteica

Para este trabajo se realizaron pruebas con diferentes concentraciones de sulfato de amonio en extractos de yacón para optimizar el proceso. En la elección de las concentraciones más adecuadas para la precipitación se tomaron como principales criterios: el porcentaje de recuperación de la proteína total y la mayor actividad específica obtenida. En la Tabla 2.4 se presentan las diferentes concentraciones de sulfato de amonio que se probaron para la precipitación efectiva de la proteína en el extracto crudo de yacón. Puede observarse que el contenido de proteína total fue similar en la mayor parte de los tratamientos, sin embargo, la diferencia es notable en la medida de la actividad enzimática total. La concentración fraccionada de 45-90% fue la que menor actividad enzimática total consiguió, mientras que con la concentración de 20-80% de sulfato de amonio se obtuvo una mayor actividad enzimática. La segunda mayor actividad se da a una concentración de 30-80% de sulfato de amonio, y aunque la actividad específica es igual a la de 20-80%, el grado de purificación con esta última fue el mayor entre los probados. Por lo tanto, se eligió utilizar una precipitación fraccionada de 20 y 80% de saturación de sulfato de amonio para la purificación enzimática de la FEH de yacón.

Tabla 2.4. Precipitación proteica del extracto de yacón usando sulfato de amonio en diferentes concentraciones

Etapas de purificación	Proteína	Actividad Total	Recuperación	Act específica	Purificación
	mg	Unid (U)	%	unid.(U) mg-1 proteína	veces
Extracto crudo	116	69	100	0.59	1
60% (NH ₄) ₂ SO ₄	36	28	41	0.77	1.3
20-70% (NH ₄) ₂ SO ₄	35	39	57	1.1	1.4
20-80% (NH ₄) ₂ SO ₄	39	50	72	1.3	1.7
45-90% (NH ₄) ₂ SO ₄	25	23	33	0.92	1.2
30-80% (NH ₄) ₂ SO ₄	34	44	64	1.3	1.5

Si bien se han utilizado variados porcentajes de saturación de sulfato de amonio en la purificación de las enzimas del metabolismo de los fructanos en diferentes especies vegetales, en la mayor parte de los casos, se realizó a través de una precipitación fraccionada en dos etapas de saturación: 20-65% (Itaya *et al.*, 2002); 20-70% (De Roover *et al.*, 1999a); 30-70% (Bonnett y Simpson 1995; Van den Ende *et al.*, 2003); 20-80% (Asega *et al.*, 2004).

5.5. Cromatografías de Purificación

Para la purificación de las enzimas del metabolismo de fructanos se han llevado a cabo diferentes métodos entre los que se encuentra la precipitación con sulfato de amonio, cromatografías de afinidad, interacción iónica, interacción hidrofóbica y exclusión molecular, cada una en diferente orden dependiendo del tipo de enzima que se quiere purificar para diferentes tipos de plantas, algunas de importancia económica como el trigo (Van den Ende *et al.*, 2003) y otras similares a la familia de las Asteraceae como la raíz de achicoria *C. intybus* (Van den Ende *et al.*, 2000).

Cromatografía de Afinidad

Los pasos de purificación se iniciaron con la cromatografía de afinidad utilizando el extracto de yacón ultrafiltrado, precipitado con sulfato de amonio (20-80%) y dializado. La Figura 2.4 presenta el perfil cromatográfico del extracto de yacón en una columna de cromatografía de afinidad Concanavalina A (Con A) Agarosa. En el cromatograma se observa la presencia de dos fracciones; la primera, que no fue adsorbida por la columna no presentó actividad hidrolítica a diferencia de la segunda fracción con actividad que se obtuvo de la elución con 0.25 M de metil- α -D-manopiranosido y 50% etilenglicol. En las fracciones que fueron colectadas del segundo pico se detectó actividad hidrolítica de la FEH sobre inulina, lo que demuestra que la proteína de interés es una glicoproteína, como

lo reportado en los extractos enzimáticos de diferentes especies de las familias Poaceae y Asteraceae (Bonnett *et al.*, 1994, De Roover *et al.*, 1999a). La acción combinada del azúcar manopiranosido y etilenglicol, hace diferencia con los métodos desarrollados por Bonnett *et al.*, 1994; De Roover *et al.*, 1999a; Marx *et al.*, 1997a; Van den Ende *et al.*, 2003 y Degasperi *et al.*, 2003 quienes utilizaron sólo el azúcar para la elución en la purificación de la glicoproteína. En otros trabajos se ha utilizado una matriz de Concanavalina conjugada con Sefarosa por la estabilidad de la resina y la baja adsorción no específica de contaminantes. Han ocurrido casos de interacciones hidrofóbicas entre el extracto enzimático y la Con A- Agarosa, como lo reportado por Davey *et al.* (1974) quien trabajó con interferón humano y la matriz Con A-Agarosa, observando la unión del interferón a la concanavalina por el reconocimiento de azúcares y la interacción hidrofóbica. Para recuperar las fracciones se hizo uso igualmente del metil- α -D-manopiranosido y etilenglicol.

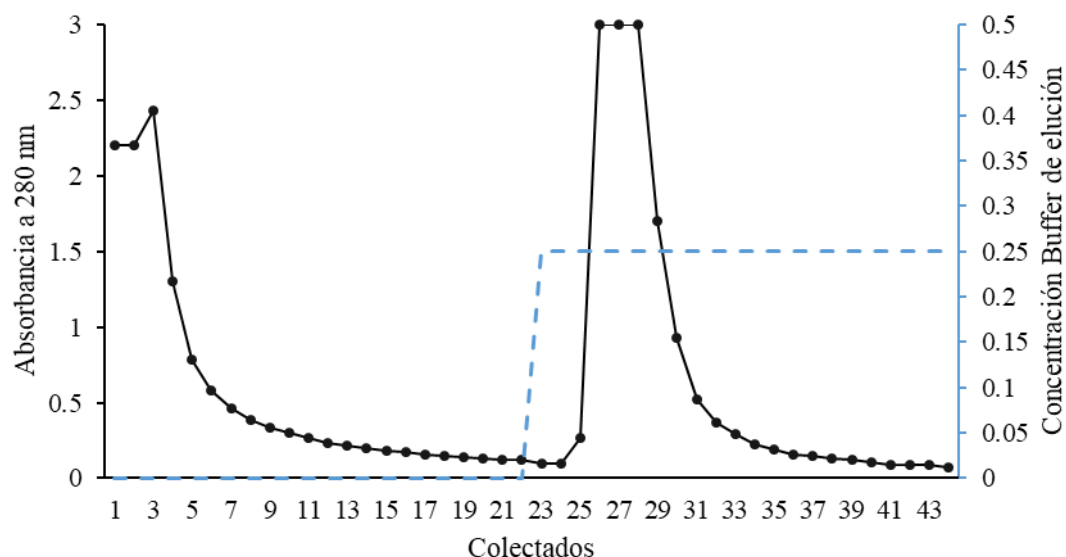


Figura 2.4. Cromatografía de Afinidad (ConA)

Cromatografía de Intercambio Aniónico

Las fracciones con actividad hidrolítica de la cromatografía de afinidad fueron dializadas, concentradas y aplicadas en una columna de intercambio aniónico Macrorep High Q.

En la Figura 2.5 se observa el perfil cromatográfico, la elución se realizó mediante gradiente discontinua de cloruro de sodio de 0.005M a 1M y se obtuvieron cuatro fracciones de proteína (evaluadas en unidades de absorbancia), de ellas presentaron actividad hidrolítica en sustrato inulina las primeras tres y fueron denominadas fracción 1, 2, 3. En el cuarto y mas grande pico no se detectó actividad enzimática.

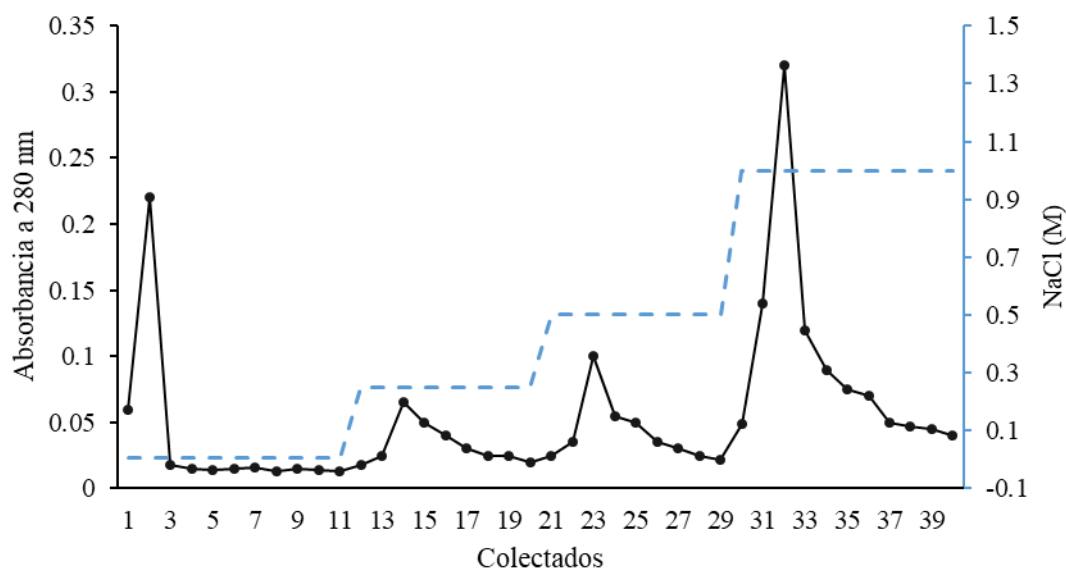


Figura 2.5. Cromatografía de Intercambio aniónico con las fracciones obtenidas de la Cromatografía de Afinidad

En la mayoría de los estudios que reportan la purificación de enzimas del metabolismo de fructanos se utiliza una columna de intercambio aniónico Mono Q en sistemas HPLC (Henson & Livingston, 1996; Marx *et al.*, 1997b; Obenland *et al.*, 1993; Claessens *et al.*, 1990; De Roover *et al.*, 1999a; Van den Ende *et al.*, 2003). En el trabajo de Henson y Livingston (1998) que purificaron una FEH de cebada se obtuvo un solo pico de actividad, así mismo con avena. Los mismos autores en 1996 obtuvieron un solo pico de actividad

hidrolasa con inulina. Ambas enzimas fueron eluidas con un gradiente lineal de cloruro de sodio desde 0 a 0.25 M.

En el trabajo de Bonnett y Simpson (1995) donde purificaron una fructano exohidrolasa de *Lolium rigidum*, se utilizó un cartucho de intercambio aniónico DEAE MemSep, se eluyó la proteína con un gradiente lineal de 0 a 0.5M de cloruro de sodio, originando dos picos de actividad, el primero que no se retuvo en la membrana presentó actividad hidrolítica y el segundo pico también. Van den Ende *et al.* (2003), purificaron dos isoformas de FEH en plantas de trigo con una combinación de cromatografía de afinidad Concanavalina (Con A) y cromatografía de intercambio aniónico con Mono Q donde se separaron dos picos de actividad, que fueron las dos isoformas de la 1-FEH reportadas en ese estudio. Claessens *et al.* (1990), purificaron inulinasa de raíces de achicoria utilizando una columna Mono Q, después de ser aplicada a una columna Con A. Igualmente con Obenland *et al.* (1993), quienes purificaron invertasas de hojas de cebada, el extracto pasó primero por una columna Con A, para luego ser cargadas a una MonoQ de intercambio aniónico.

Cromatografía de exclusión molecular

Las fracciones con actividad provenientes de la cromatografía de intercambio aniónico fueron aplicadas en conjunto a una columna (0.75 x 57 cm) Superdex 75 prep grade, que fue equilibrada en buffer 10 mM citrato-fosfato pH 5.5 y 0.2 M de cloruro de sodio. Las proteínas fueron eluidas en el mismo buffer con un flujo de 0.3 mL min⁻¹ L.

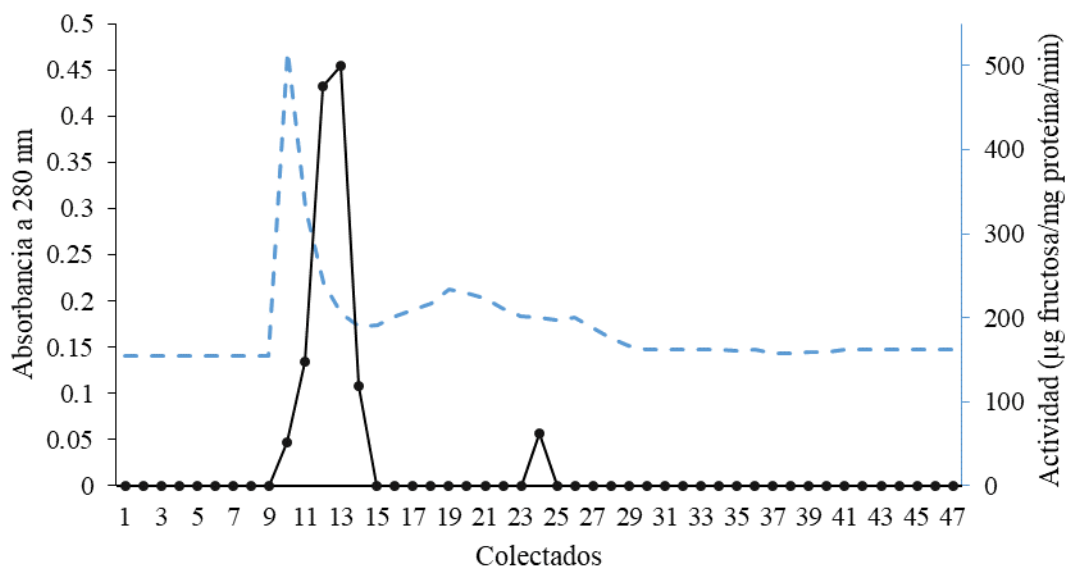


Figura 2.6. Cromatografía de Exclusión molecular

En esta cromatografía se pudo observar un primer pico de absorbancia (Figura 2.6), el cual presentó actividad FEH a partir de la décima fracción siendo su máximo en la fracción trece (500.40 μg fructosa/mg proteína/min) hasta la fracción catorce donde la actividad cayó, luego se puede observar que hay dos picos de absorbancia juntos y entre éstos presentan una pequeña actividad (62.58 μg fructosa/mg proteína/min). Esto nos indicaría que la muestra no se encontraba purificada a homogeneidad o se tendría más de una proteína con actividad FEH. En el trabajo de Henson y Livingston (1996) purificaron la exohidrolasa de avena para fructanos β-2,6 utilizando para el proceso la precipitación con sulfato de amonio seguida de intercambio iónico, interacción hidrofóbica y cromatografía de exclusión molecular, obteniendo finalmente un solo pico correspondiente a una molécula de 43 kD. Por otro lado, Claessens *et al.* (1990), purificando la inulinasa de achicoria a homogeneidad utilizaron matrices de intercambio

iónico, de afinidad, columnas de intercambio Mono Q y Mono S para luego utilizar una columna de exclusión Superose 12 donde al final obtuvieron igualmente un pico correspondiente a una proteína de 68 kD.

A partir de estos resultados se decidió comparar dos protocolos de purificación (Figura 2.7).

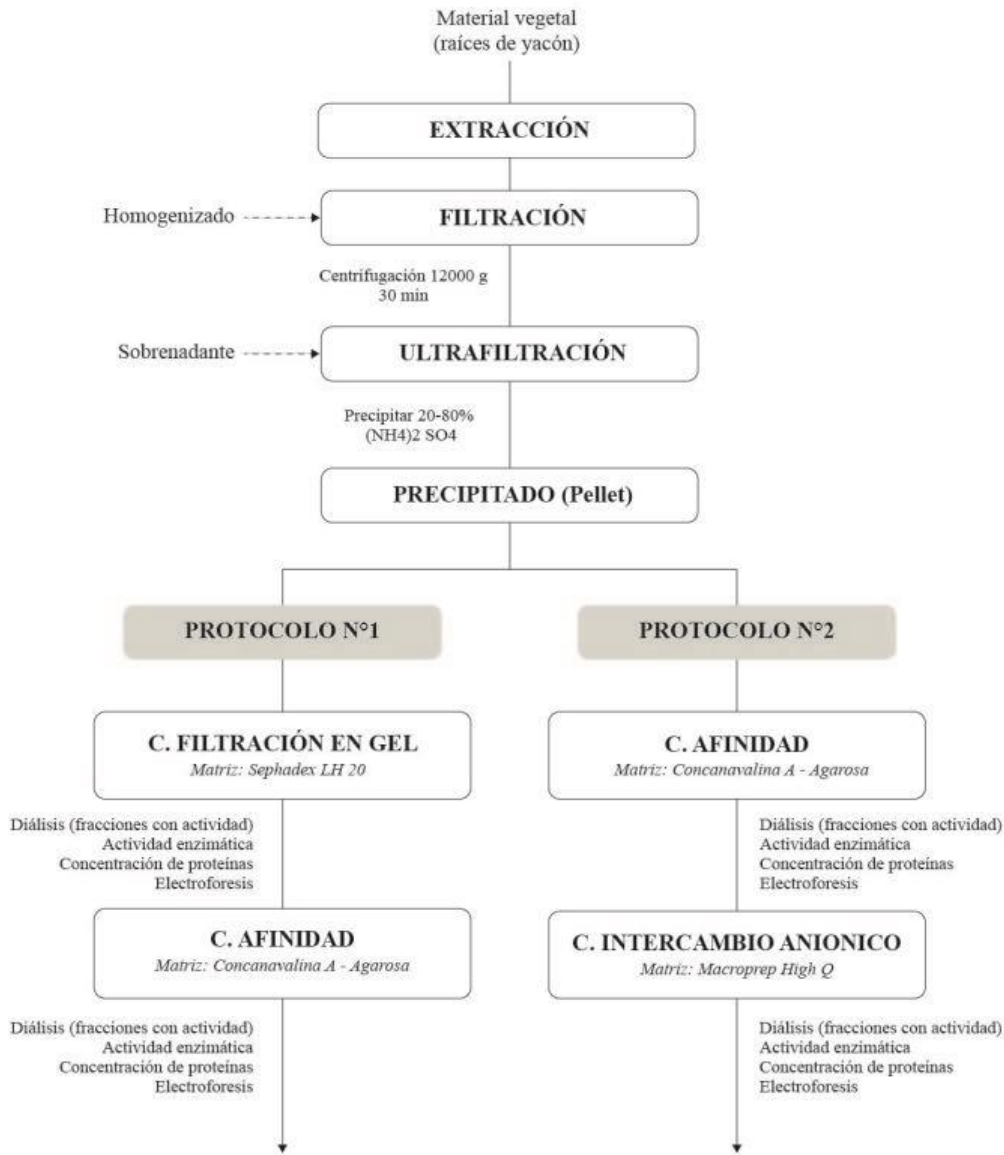


Figura 2.7. Flujograma de trabajo para la purificación de la FEH.

Los dos procedimientos de purificación para la enzima fructano exohidrolasa (FEH) variaron en el orden de los tipos de cromatografía utilizado en cada uno. Estos protocolos

fueron comparados en términos de rendimiento, actividad específica y grado de purificación.

Ambos procedimientos utilizaron la técnica de ultrafiltración y precipitación con sales de Sulfato de amonio para la concentración del extracto enzimático. El primer protocolo utilizó cromatografía de filtración en gel con una matriz de Sephadex LH-20, seguido por una cromatografía de afinidad con una matriz de Concanavalina A. El segundo protocolo utilizó una cromatografía de afinidad (Con A) seguido de una cromatografía de intercambio iónico con el intercambiador aniónico Macrorep High Q (Bio-Rad). En ambos protocolos se evaluó la actividad de la enzima en cada etapa de la purificación.

En la Tabla 2.5 se observan los resultados con la medida de la actividad de la enzima utilizando los sustratos inulina y kestosa. Si bien la enzima logra una mayor actividad específica sobre el sustrato kestosa que con la inulina, se observa que en algunas de las etapas de purificación tanto el rendimiento como el grado de purificación fueron mayores medidos con el sustrato inulina. En el paso de purificación con la cromatografía de afinidad (Concanavalina A) se observó que la enzima perdió actividad (de 4.004 a 2.796 U/ml) medida con el sustrato inulina, lo contrario para la medición con el sustrato kestosa que siguió incrementándose (de 9.836 a 10.160 U/ml) con un mayor rendimiento (17.10 %) y también un mayor grado de purificación (50.91 veces). De Roover *et al.* (1999a) purificaron una 1-FEH II a partir de raíces de achicoria mediante una combinación de precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de afinidad con concanavalina A (Con A) y cromatografía de intercambio aniónico y catiónico. Este protocolo produjo una purificación 70 veces mayor y una actividad específica de 52 nkat/ de proteína, que equivale aproximadamente a 3.12 U/mg de proteína. Por otro lado, Van den Ende *et al.* (2000), purificaron una 1-FEH I de *C.intybus* utilizando un extracto dializado que fue cargado previamente a una columna de intercambio catiónico S Sefarosa para luego

utilizar cromatografía de afinidad (ConA) , seguida de cromatografías de intercambio aniónico y de intercambio catiónico con diferentes pH en los siguientes pasos. Ellos lograron purificar y separar una 1-FEH I de una 1-FEH II con la particular observación que la 1-FEH II fue retenida en la columna Mono Q de intercambio aniónico a pH 7.5 mientras que la 1-FEH I no, facilitando su separación. En el 2001, el mismo grupo de trabajo aisló dos isoformas enzimáticas activas e independientes de la 1-FEH II de *C. intybus* denominadas 1-FEH IIa y 1-FEH IIb con gran homología entre ambas y mostrando un diferente patrón de expresión y regulación respecto a la 1-FEH I en esta especie (Van den Ende *et al.*, 2001).

El segundo protocolo se presenta en la Tabla 2.6, las actividades se determinaron solamente con el sustrato inulina. Si bien las actividades específicas de este protocolo son menores para el pellet obtenido de la precipitación de sulfato de amonio y para la purificación en cromatografía de afinidad, se obtiene un mayor factor de purificación en la última etapa con la cromatografía de intercambio aniónico. (109.12 veces) y una actividad específica de 62.7 U/mg de proteína . Un trabajo de purificación de dos isoformas 1-FEH de trigo (w1 y w2) se realizó utilizando una combinación de cromatografía de afinidad (Con A) y cromatografía de intercambio aniónico (MonoQ) a diferentes pH. Se produjeron pérdidas de actividad considerables en las cromatografías obteniéndose una purificación máxima de aproximadamente 90 veces para 1-FEH w1 y de aproximadamente 76 veces para 1-FEH w2, lo que dio lugar a una actividad específica de 14,6 y 12,2 U/mg de proteína, respectivamente. (Van den Ende *et al.*, 2003). Posteriormente, Van Riet *et al.* (2008) purificaron una tercera isoforma 1-FEH de trigo (w3), con el mismo procedimiento de purificación , obteniendo una proteína de 70kDa con una especificidad diferente a las dos isoformas de trigo previamente purificadas , esta proteína

mostró una actividad notablemente mayor sobre inulina y una ligera actividad sobre sacarosa que los autores desestimaron.

Tabla 2.5. Purificación de la enzima FEH según el primer protocolo utilizando sustratos inulina y kestosa.

INULINA								
Etapas de purificación	Volumen	Proteína	Proteína total	Actividad	Act. específica	Actividad total	Rendimiento	Purificación
	mL	mg/mL	mg	U/mL	U/mg	U		
Extracto crudo	600	0.258	154.8	0.330	1.279	198.00	100.00	1.000
UF	465	0.295	137.18	0.317	1.075	147.41	74.45	0.840
SO ₄ (NH ₄) ₂ 20-80%	30	0.564	16.92	4.013	7.115	120.39	60.80	5.563
Cromatografía Ex. Molecular (LH-20)	15	0.257	3.86	4.004	15.58	60.06	30.33	12.181
Cromatografía Afinidad (ConA)	10	0.052	0.52	2.796	53.769	27.96	14.12	42.038

KESTOSA								
Etapas de purificación	Volumen	Proteína	Proteína total	Actividad	Act. específica	Actividad total	Rendimiento	Purificación
	mL	mg/mL	mg	U/mL	U/mg	U		
Extracto crudo	600	0.258	154.8	0.990	3.837	594.00	100.00	1.000
UF	465	0.295	137.18	0.967	3.278	449.66	75.70	0.854
SO ₄ (NH ₄) ₂ 20-80%	30	0.564	16.92	6.870	12.181	206.10	34.70	3.174
Cromatografía Ex. Molecular (LH-20)	15	0.257	3.86	9.836	38.272	147.54	24.84	9.974
Cromatografía Afinidad (ConA)	10	0.052	0.52	10.160	195.385	101.60	17.10	50.918

Tabla 2.6. Purificación de la enzima FEH según el segundo protocolo utilizando sustrato inulina.

INULINA								
Etapas de purificación	Volumen	Proteína	Proteína total	Actividad	Act. específica	Actividad total	Rendimiento	Purificación
	mL	mg/mL	mg	U/mL	U/mg	U		
Extracto crudo	1500	0.134	201	0.077	0.575	115.50	100.00	1.000
UF	250	0.586	146.5	1.470	2.509	367.50	318.18	4.365
SO ₄ (NH ₄) ₂ 20-80%	30	0.857	25.71	2.210	2.579	66.30	57.40	4.488
Cromatografía Afinidad (Con A)	20	0.319	6.38	2.187	6.856	43.74	37.87	11.931
Crom. Int. Aniónico (Macrorep High Q)	4	0.034	0.136	2.132	62.706	8.53	7.38	109.125

5.6. Electroforesis

Cada una de las etapas de purificación fue analizada en un gel de electroforesis de poliacrilamida en condición desnaturalizante (SDS-PAGE). En la electroforesis del primer protocolo de purificación (Figura 2.8), sólo se puede observar el recorrido con el fondo teñido para el extracto concentrado (UF) al igual que para el pellet. En el pocillo de LH-20 (cromatografía de exclusión molecular) se observa el mismo patrón que el pellet, a pesar de haber mostrado diferencias en actividad enzimática. En la purificación utilizando ConA (cromatografía de afinidad), las bandas nítidas se encuentran la altura de la Albúmina Sérica (66 kDa) correspondiente a 71.9 kDa, otra banda a la altura de la enzima Ovoalbúmina (45 kD) que correspondería a 55.2 kDa y una más a la altura de la enzima Anhidrasa carbónica (29 kDa), que correspondería a 26.2 kDa.

En la Figura 2.9 se presenta el gel teñido para las muestras provenientes del segundo protocolo y de las diferentes etapas de purificación. Puede observarse que en las primeras etapas de purificación (UF extracto concentrado; Pellet extracto crudo precipitado y dializado), no es posible diferenciar bandas, sólo un fondo difuso; en el pocillo del pellet todavía se observa un fondo teñido, pero se empiezan a distinguir bandas, lo cual sugiere que el extracto precipitado con sulfato de amonio contiene una mezcla de proteínas. En el pocillo de la primera cromatografía ConA las bandas se hacen más notorias, hay bandas más nítidas que las demás, una de ellas a la altura del peso molecular de la proteína Ovoalbúmina (45 kD) que le corresponde un peso de 52.03 kDa y la otra banda más nítida está al nivel del inhibidor de tripsina (20 kDa) la cual le corresponde un peso de 24.09 kDa. En el siguiente pocillo (F1) correspondiente a la primera fracción de actividad de la cromatografía de intercambio aniónico (Macroprep High Q) se observan varias bandas, una de ellas la más nítida, que se encuentra al nivel de la Albúmina Sérica (66 kDa) y tiene un valor de 64.84 kDa. En los pocillos que corresponden a la fracción 2,3 y 4 (F2)

(F3) y (F4), si bien no se observan bandas nítidas, se distingue un área difusa en cada una, lo que podría sugerir que se trate de isoformas de acuerdo a lo encontrado por otros autores (Obenland *et al.*, 1993; Van den Ende *et al.*, 2001)

Henson y Livingston (1998) desarrollaron la purificación de una fructano exohidrolasa de cebada a homogeneidad con un peso molecular de 33 kDa para una SDS-PAGE, sin embargo, en un trabajo previo bajo condiciones no desnaturalizantes obtuvieron una banda de 62.5 kDa determinado por cromatografía de exclusión molecular, sugiriendo que la enzima sería un homodímero. Otras fructano exohidrolasas de plantas superiores han sido reportadas como monoméricas con pesos moleculares de 43, 57 y 70 kDa (Claessens *et al.*, 1990; Yamamoto y Mino 1985). Marx *et al.* (1997a) y De Roover *et al.* 1999a obtuvieron una fructano exohidrolasa de *Helianthus tuberosus* y una 1-FEH II de *C. intybus* con un aparente peso molecular de 79 kDa y 64 kDa respectivamente, a nivel de electroforesis SD-PAGE.

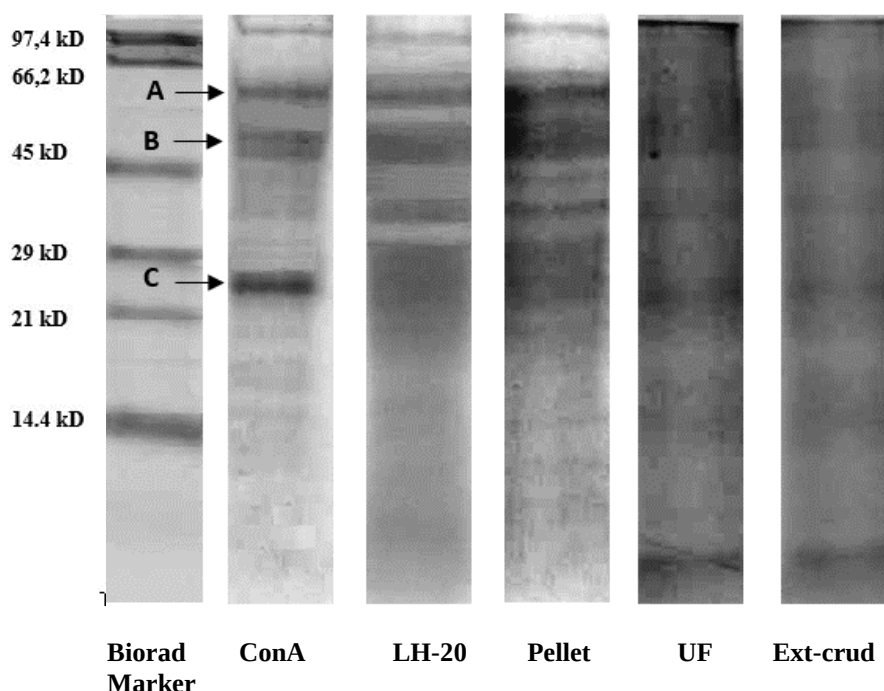


Figura 2.8. Gráfico representativo de la electroforesis en cada paso de la purificación en el primer protocolo .

Proteína	PM (kD)	Log PM	Rf
Fosforilasa B	97.4	1.9886	0.0769
Albúmina sérica	66.2	1.8209	0.1231
Ovoalbúmina	45.0	1.6532	0.3077
Tripsinógeno	29.0	1.4624	0.4615
Inhibidor de Tripsina	21.0	1.3222	0.5385
Lisozima	14.4	1.1584	0.7231
Proteína A	71.9	1.8567	0.4923
Proteína B	55.2	1.7419	0.2308
Proteína C	26.2	1.4183	0.1385

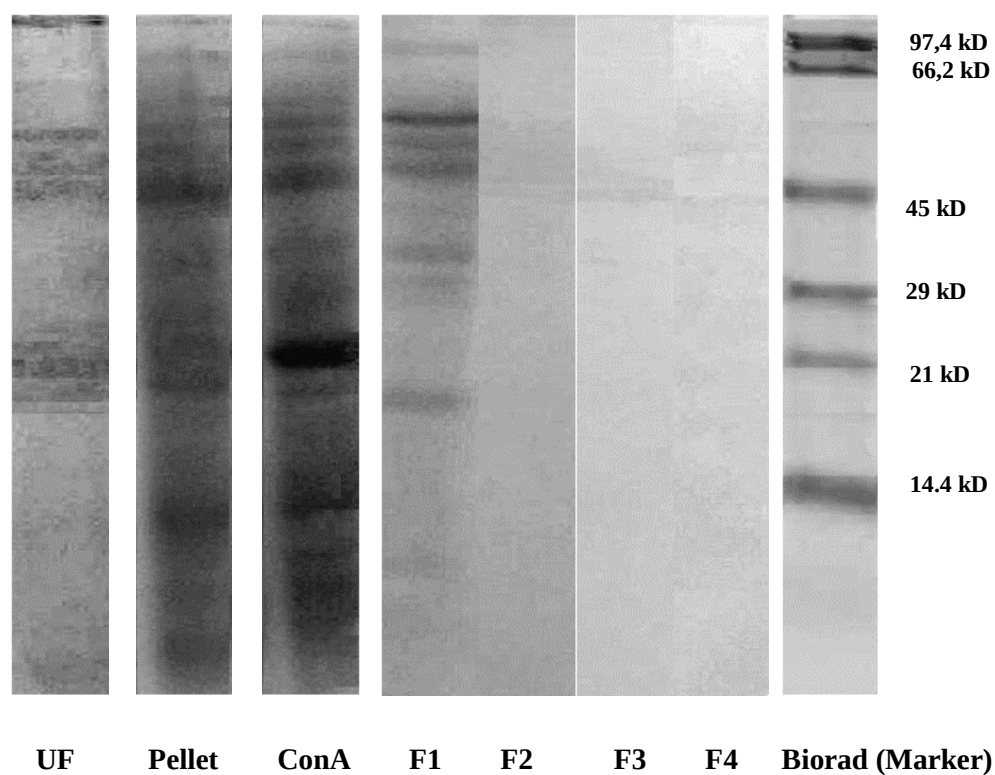


Figura 2.9. Gráfico representativo de la electroforesis en cada paso de la purificación en el segundo protocolo .

5.7. Especificidad de la fructano exohidrolasa parcialmente purificada sobre diferentes sustratos

Para la evaluación de la actividad FEH sobre diferentes sustratos se utilizó la fracción purificada proveniente de la Cromatografía de Afinidad (Con A). En la Figura 2.10 se muestra la actividad del extracto con el sustrato sacarosa (200 mM). Se observó la presencia mínima de fructosa (0.0631 $\mu\text{g/mL}$) y glucosa (0.0992 $\mu\text{g/mL}$), así como kestosa (1.57 $\mu\text{g/mL}$), lo cual sugiere actividad enzimática diferente de FEH. Es importante tener en cuenta que para el caso de otras asteráceas que acumulan fructanos y de monocotiledóneas como el trigo, se ha documentado la presencia de isoformas Ci1-FEHIIa y Ci1-FEHIIb de *C. intybus* (Van den Ende *et al.*, 2001), Ht1-FEHI Ht1-FEHII y Ht1-FEHII en *Helianthus tuberosus* (Xu *et al.*, 2015; Zhan *et al.*, 2018) y 1-FEHw1, 1-FEHw2 y 1-FEHw3 de *Triticum aestivum* (Van den Ende *et al.*, 2003; Van Riet *et al.*, 2008). Varias de estas isoformas mantienen una alta identidad entre ellas aún cuando se expresan bajo diferentes condiciones, están reguladas de manera diferente y en muchos casos el perfil de expresión de estas isoformas depende en gran medida del desarrollo de la planta y de la respuesta a condiciones ambientales y hormonales (Meguro-Maoka y Yoshida 2016; Wu *et al.*, 2021). Si bien se establece que las FEHs en general no pueden hidrolizar la sacarosa, Xu *et al.* (2015) determinaron una ligera actividad sobre la sacarosa en la isoforma Ht1-FEH-II de *Helianthus tuberosus* y mas tarde Zhan *et al.* (2018) clonando la tercera isoforma de la 1-FEH de *H. tuberosus* y expresándola en *Pichia pastoris*, demostraron actividad hidrolítica no solo hacia los fructanos $\beta(2,1)$ sino también hacia la sacarosa. Aunque se ha reportado ampliamente que la sacarosa inhibe la actividad de la 1-FEHs en *Chrysolaena obovata* (Asega *et al.*, 2008), *Triticum aestivum* (Van den Ende *et al.*, 2003), *Lolium perenne* (Lothier *et al.*, 2007), el nivel de inhibición no fue el mismo en estos estudios y aparentemente varía entre especies y entre isoformas

dentro de una misma especie. Un comportamiento variable también podría atribuirse a las invertasas con respecto a su especificidad con la sacarosa, Van den Ende y Van Laere (1993), purificaron una invertasa a partir de raíces de *C. intybus* que mostró actividad hidrolítica cuando el sustrato sacarosa se encontraba en bajas concentraciones, sin embargo, en concentraciones mas altas del mismo sustrato, sintetizaban 1-kestosa. Igualmente, Obenland *et al.* (1993), purificando invertasas de cebada, encontraron que las 3 isoformas purificadas mostraban capacidad de síntesis de 1-kestosa (actividad SST) cuando el sustrato sacarosa se encontraba concentrado a 600 mM. En la medida que las 1-FEHs están muy relacionadas evolutivamente con las invertasas de pared celular se hace necesaria la caracterización molecular de las posibles isoformas presentes en el yacón y su expresión heteróloga para verificar su función y regulación.

Con los sustratos kestosa (200 mM) y nistosa (200 mM), el extracto presentó actividad FEH produciendo fructosa, siendo mayor la concentración de fructosa liberada (10.14 μg / mL) cuando el sustrato fue kestosa respecto a un 8.95 μg / mL con el sustrato nistosa. Con el sustrato inulina la actividad FEH no produjo fructosa (Anexo 6). Si bien la inulina pertenece a la serie de fructanos lineales con enlace β -(2,1) similar a los oligofructanos del yacón, este sustrato no forma parte de su composición química natural, lo que podría explicar la baja actividad mostrada por el extracto purificado. Asi también se confirmaría a través de este estudio que la FEH de yacón tiene mayor afinidad por los fructanos de bajo grado de polimerizacion según lo señalado por Itaya *et al.*, 2007 y Narai-Kanayama *et al.* , 2007)

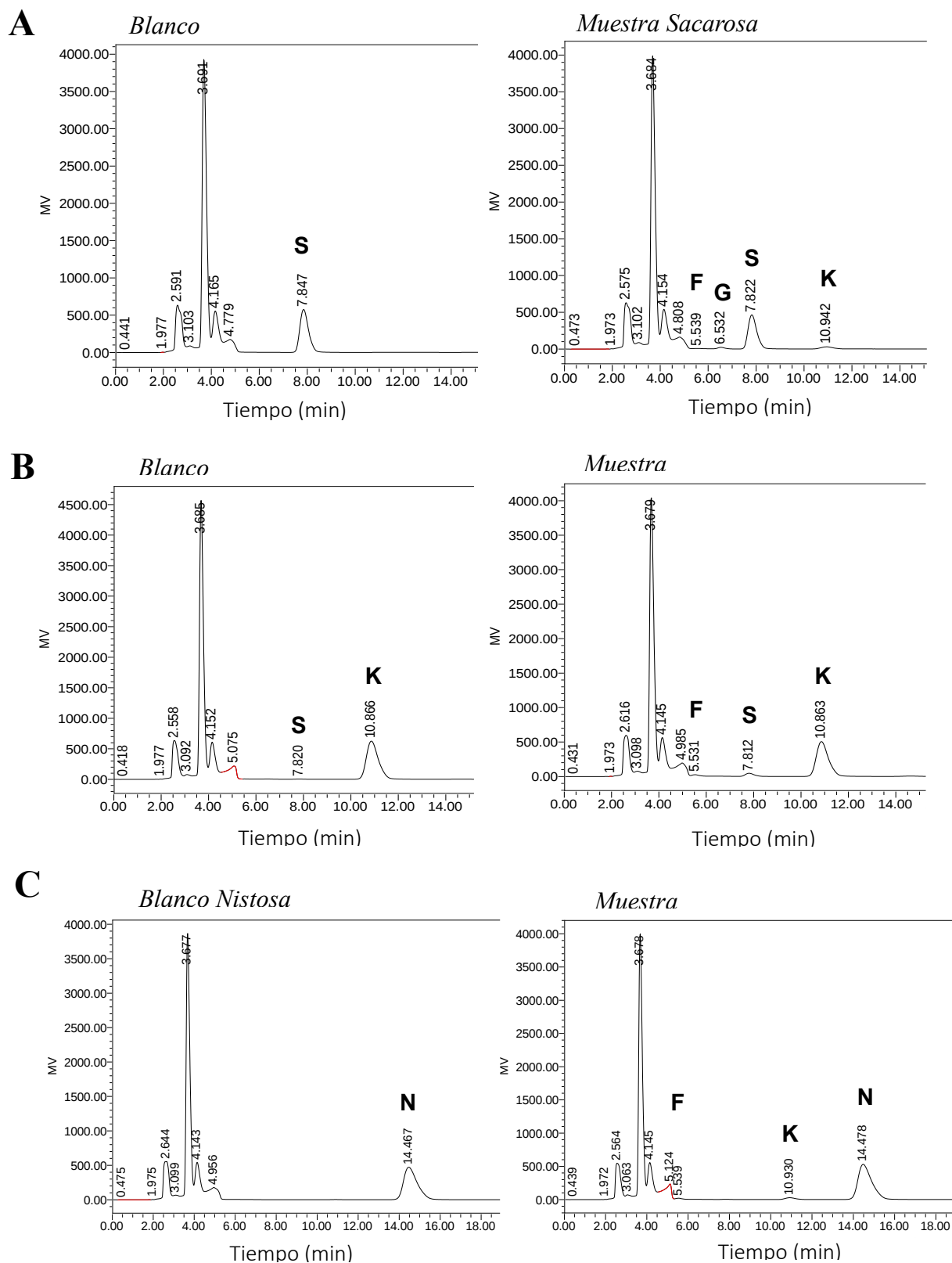


Figura 2.10. Especificidad con la enzima FEH sobre sustrato (A) sacarosa, (B) kestosa y (C) nistosa.

Estos resultados también sugieren que la FEH purificada del extracto de yacón puede ser mas afín a los fructanos de menor grado de polimerización que aquellos de cadena larga. Degasperi *et al.* (2003), observaron que la FEH de las raíces tuberosas de *Viguiera discolor* presentaba mayor afinidad por los oligosacáridos kestosa y nistosa, que por su propia inulina. Por otro lado, Van den Ende *et al.* (2003), caracterizando dos isoformas FEH purificadas del trigo para evaluar la especificidad con diferentes fructanos, observaron que las enzimas hidrolizaron más eficientemente los enlaces β -(2,1), entre los cuales 1-kestosa y 1,1-nistosa, fueron los mejores sustratos.

6. CONCLUSIONES

- La máxima actividad específica FEH en extracto crudo de yacón se alcanzó en el mes 11 del cultivo, correspondiente con el tercer mes de rebrote de la planta después de la helada. Estos valores fueron de 20.33 U/mg con el sustrato Kestosa y 2.65 U/mg para Inulina.
- El extracto crudo de la accesión AMM5163 de yacón presentó una actividad FEH óptima a pH 5.5, temperatura óptima de 30 °C, concentración de sustrato inulina de 50 mg/ml (5 %) y un tiempo de reacción de 6 a 8 horas.
- La precipitación proteica fraccionada del extracto de yacón utilizando sulfato de amonio (20-80%) permitió obtener un mayor porcentaje de recuperación de proteína total y mayor actividad específica.
- El Protocolo 1 de purificación que utilizó cromatografía de filtración en gel seguida de cromatografía de afinidad, permitió un rendimiento de 14.12 %, purificando la enzima 42 veces medida con el sustrato inulina y un rendimiento de 17.10% con un grado de purificación de 51 veces con el sustrato kestosa. La electroforesis del extracto purificado mostró tres bandas con pesos moleculares de 71.9kDa, 55.2kDa y 26.2kDa.
- El Protocolo 2 de purificación que utilizó cromatografía de afinidad seguida de cromatografía de intercambio aniónico, permitió un rendimiento de 7.38 %, purificando la enzima 109.12 veces medida con el sustrato inulina. En la electroforesis del extracto purificado se observó una sola banda de 64.84 kDa.
- La especificidad de la enzima FEH purificada medida con los sustratos sacarosa, kestosa y nistosa comprobó que la enzima no se purificó a homogeneidad. Con sacarosa hubo una producción mínima de glucosa y fructosa sugiriendo una actividad enzimática diferente de FEH. Con kestosa y nistosa se obtuvo 10.14

$\mu\text{g/mL}$ y $8.95 \mu\text{g/mL}$ de fructosa respectivamente, mientras que con inulina no se obtuvo actividad FEH. Esto sugiere que la enzima parcialmente purificada tiene mayor afinidad por los sustratos de cadena corta (kestosa) que por los de cadena larga (inulina).

CAPITULO 3

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA FEH DE YACON A PARTIR DE LA OBTENCION DEL ADNc DE LAS RAICES RESERVANTES.

1. RESUMEN

La secuencia de aminoácidos de la FEH de yacón fue identificada de manera casi completa a través de la obtención del ADN complementario (ADNc) a partir de la extracción de ARN de sus raíces. Por el alto contenido de polisacáridos en los órganos de reserva, se hizo necesario optimizar un protocolo de purificación del ARN total, siendo el protocolo del CTAB modificado, el que mejor resultado proporcionó en términos de pureza y rendimiento. La secuencia de nucleótidos codificantes de la enzima fue ensamblada a partir de las secuencias sobrelapadas obtenidas por amplificación mediante RT-PCR y el uso de *primers* degenerados y específicos. Se obtuvo también la región 3'UTR del ADNc a través del uso de RACE-3'. Las aproximaciones para obtener el extremo 5' (IPCR, RACE-5), no dieron el resultado esperado. Sin embargo, mediante el análisis *in-silico* se obtuvo posteriormente la secuencia de nucleótidos faltantes de esta región. El análisis filogenético de la secuencia de aminoácidos inferida en este trabajo comparada con las FEH de otras especies vegetales relacionadas mostró alta identidad porcentual en relación a las 1-FEHs de *H. annuus* (88.37), *H. tuberosus* (87.41), *C. intybus* (85.62), y *V. herbácea* (83.54). Se verificó la presencia de los tres residuos activos (triada catalítica), altamente conservados típicos de la familia de las glucósido hidrolasas GH-J (32, 68). Se comparó la secuencia de aminoácidos inferida de la enzima FEH de yacón con la secuencia relacionada de achicoria (1ST8) depositada en la PDB (Protein Data Base), y fue posible predecir la estructura 3D de la proteína (Swiss Model- Alpha Fold), observándose una alta similitud estructural con la 1-FEH IIa (1ST8).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

- Identificar la secuencia de aminoácidos de la FEH en las raíces reservantes de yacón y predecir la estructura proteica así como su funcionalidad.

2.2. Objetivos específicos

- Optimizar un método de extracción y purificación de ARN total de las raíces reservantes de yacón.
- Obtener la secuencia de nucleótidos y hacer una predicción de la secuencia de aminoácidos correspondiente de la FEH de yacón.
- Predecir la estructura cuaternaria de la proteína FEH por homología estructural y reconocer sus principales sitios de actividad.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Aproximaciones en la extracción y purificación del ARN total

Un paso importante en el desarrollo y aplicación de las pruebas moleculares es la extracción de los ácidos nucleicos, éstos deben tener una adecuada calidad basada en su pureza y en una cantidad mínima por encima del límite de detección de cada prueba a realizar.

La extracción de ARN total (incluyendo ARN mensajero, ribosomal y de transferencia, entre otros) permite el secuenciamiento y la cuantificación del ARNm, base de los estudios de expresión génica. Además, obtener secuencias de genes a partir de clones derivados de ARNm es más simple y práctico que desde el ADN genómico, debido al menor tamaño y menor complejidad de este último (alternancia de exones e intrones) (Ali *et al.*, 2017).

La purificación de un ARN total con un nivel adecuado de pureza, presenta limitantes intrínsecas tanto de la estructura y composición de la célula, como de la técnica a utilizar, podemos citar por ejemplo la presencia natural de ARNasas y de polifenoles que degradan rápidamente el ARN, presencia de abundantes polisacáridos que dificultan el proceso de extracción en las células vegetales y la preparación del personal, entre otros. Existen numerosos métodos de extracción y purificación de ARN descritos en la literatura científica, muchos de ellos variaciones adaptadas en cada laboratorio y para una muestra en particular a partir de métodos desarrollados anteriormente y aún vigentes (Chomczynski *et al.*, 2006). La purificación de ARN utilizando kits comerciales se ha convertido en un método rutinario, rápido y práctico que provee de una cantidad de ARN en suficiente calidad y cantidad para la mayoría de pruebas en las que esté involucrado su uso, aunque para muchos laboratorios sigue siendo algo costoso (Yaffe *et al.*, 2012).

Las ARNasas presentes en la naturaleza son abundantes, tienen como características principales ser muy estables y activas, pueden soportar temperaturas sobre los 100 °C, como el caso de la ARNasa A, que degrada rápidamente el ARN. El uso de una sal caotrópica (isotiocianato de guanidina, clorhidrato de guanidina, cloruro de litio, úrea, etc.), ha sido hasta el día de hoy de uso frecuente en el proceso de extracción rutinaria tanto de ARN como de ADN y es base de la composición de muchos de los buffers de kits comerciales. Estas sales tienen el propósito de ayudar a lisar las células y desnaturalizar las proteínas al romper la estructura cuaternaria y ternaria (Yaffe *et al.*, 2012).

Los polisacáridos son abundantes en las células vegetales, su presencia interfiere en el proceso de extracción y purificación del ARN al formar mucílagos y aparentemente capturar a los ácidos nucleicos, limitando grandemente el uso de órganos de reserva como material a partir del cual se extraen los ácidos nucleicos. Esto se convierte en un problema

cuando se trata de ARNs mensajeros que se expresan únicamente o en mayor cantidad en estos órganos. El uso de clorhidrato de guanidina en lugar del isotiocianato de guanidina ayuda a evitar la formación del mucílago (Wang y Stegemann., 2010; Rubio-Piña y Zapata-Pérez., 2011).

Los polifenoles existentes en las plantas presentan un limitante serio en el proceso de purificación de ácidos nucleicos, en una célula íntegra los polifenoles están separados de las polifenol oxidasas al encontrarse en organelos distintos (compartimentalización celular). Durante el proceso de extracción de ácidos nucleicos las células son lisadas y el contenido celular es liberado, para evitar la oxidación de las sustancias polifenólicas es necesario utilizar una sustancia antioxidante como β -mercaptoetanol, sulfito de sodio, nicotina, ácido ascórbico o ácido cítrico. Entre ellas, el β -mercaptoetanol es el más utilizado y de mejor resultado, sin embargo, existe determinado material vegetal en el que la combinación de dos antioxidantes es el adecuado para evitar la oxidación fenólica de manera eficiente (Wang y Stegeman., 2010; Rubio-Piña y Zapata-Pérez., 2011).

3.2. Estudios previos de obtención de FEHs

Todas las FEH conocidas están relacionadas con invertasas de tipo pared celular (Van den Ende *et al.*, 2004). En la última década del siglo pasado se clonó un grupo de enzimas del tipo endo y exo FEH microbianas y fructosil transferasas vegetales. La clonación de ADNc de fructosil transferasas demostró que estaban estrechamente relacionadas con las invertasas vacuolares (Ritsema y Smeekens, 2003), de hecho, los experimentos de aislamiento de vacuolas demostraron que los fructanos y las enzimas que los transforman, incluidas las fructosil transferasas y las FEH, estaban presentes en la vacuola (Darwen *et al.*, 1989), esto condujo al estudio de genes similares a la invertasa vacuolar como genes candidatos de las FEH.

Las primeras secuencias de FEH vegetales se obtuvieron en achicoria *Cichorium intybus* L. (Van den Ende *et al.*, 2000, Van den Ende *et al.*, 2001) y trigo (Van den Ende *et al.*, 2003a). Mediante la purificación de las enzimas FEH nativas de la achicoria, el uso de la información de la secuencia de aminoácidos y el uso de técnicas de clonación basadas en RT-PCR, se obtuvieron los primeros ADNc de FEH. Entonces se descubrió que las secuencias de aminoácidos derivadas de las FEH estaban muy relacionadas con las invertasas de la pared celular y no con las invertasas vacuolares, a pesar de su localización vacuolar. La filogenia de las FEH de origen vegetal muestra que estas se agrupan en un subgrupo distinto entre las denominadas invertasas de tipo pared celular y más alejadas de las FEH microbianas (Van den Ende *et al.*, 2004).

Hasta la fecha se han identificado al menos tres tipos de FEHs vegetales. Las 1-FEHs que hidrolizan fructanos β (2,1)-ligados; las 6-FEHs que descomponen fructanos β (2,6)-ligados; y las 6 & 1-FEHs que degradan tanto fructanos β (2,1)- como β (2,6)-ligados. Las 1-FEHs se han estudiado ampliamente en plantas como la *C. intybus* y *Helianthus tuberosus*, que almacenan principalmente fructanos de tipo inulina. La primera 1-FEH vegetal (1-FEH I) aislada se clonó a partir de la achicoria mediante RT-PCR (Van den Ende *et al.* 2000), y posteriormente se caracterizaron dos isoformas 1-FEH II (1-FEH IIa y IIb) de *C. intybus* (Van den Ende *et al.*, 2001). Desde entonces, se han descrito ADNc de 1-FEHs en *Lolium perenne*, *Vernonia herbacea*, *Arctium lappa*, trigo y *Campanula rapunculoides* (Lothier *et al.*, 2007; Asega *et al.*, 2008; Ueno *et al.*, 2011; Van den Ende *et al.*, 2003a; Le Roy *et al.*, 2007c). En *Phleum pratense*, se descubrió que una 6-FEH funciona en la hidrólisis de levanos **de** alto grado de polimerización (Tamura *et al.*, 2011) y que las 6&1- FEHs de trigo degradan selectivamente graminanos pequeños (Kawakami *et al.*, 2005). En el trigo se identificaron dos 6-kestosidasas (6-KEHs) más específicas, que descomponen preferentemente el trisacárido 6-kestosa (Van den Ende *et al.*, 2005).

Las FEHs se encuentran en algunas plantas sin fructosa; el caso de la 6-FEH en *Beta vulgaris* y de 1-FEH en *Arabidopsis* (Coninck *et al.*, 2005; Van den Ende *et al.*, 2003b). Aunque en la década de 1960 se estableció que en *H. tuberosus* se producen al menos dos hidrolasas (A y B) que degradan la inulina lineal, sólo se purificó una hidrolasa en una única banda mediante SDS-PAGE (Marx *et al.*, 1997), ésta correspondería con la 1-FEH de la especie (Xu *et al.*, 2015).

3.3. Técnicas moleculares para la obtención de FEHs

El esquema básico y principal en la obtención de la mayoría de secuencias de las FEH es la técnica de RT-PCR, seguida de clonación en plásmido, transformación de *E. coli* y secuenciamiento con cebadores específicos del vector (Van den Ende *et al.*, 2000, Van den Ende *et al.*, 2001, Asega *et al.*, 2008). Los genes completos de las FEH, de *C. intybus*, *V. herbácea*, entre otras, se obtuvieron principalmente ensamblando los segmentos de secuencias sobrelapadas obtenidos por amplificación, clonación, IPCR y secuenciación directa (Van den Ende *et al.*, 2000; Asega *et al.*, 2008).

Lothier *et al.*, (2007), utilizaron una biblioteca de cDNA de *Lolium perenne* para rastrear clones con homología a 1-FEH (en particular a la 1-FEH de trigo), obteniendo dos cDNAs parciales: Lp1 FEHa y Lp1 FEHa S, con el mismo marco de lectura abierto (ORF) pero diferente longitud en la zona 3' UTR. .Tras tres rondas de purificación de clones positivos, los insertos fueron cortados, recircularizados en un vector tipo pBluescript y secuenciados; luego se compararon las secuencias con las de la base NCBI, confirmando la alta homología con 1 FEH de trigo.. Una aproximación similar fue utilizada por Tamura *et al.* (2011) para obtener el gen de la FEH de *P. pratense* L., a partir de una biblioteca de clones previamente generada (Tamura *et al.*, 2009).

El ADNc de 1-FEH de *A. lappa*, se obtuvo mediante RT-PCR, seguido del método RACE, utilizando primers degenerados basados en las secuencias de aminoácidos de FEH de otras especies vegetales. Un ADNc de longitud completa llamado *aleh1* de 2063 pb fue obtenido, mostrando un marco de lectura abierto (ORF) de 1746 pb y una secuencia poli (A) en el extremo 3'. El ORF codificaba un polipéptido de 581 aminoácidos correspondiente a la FEH de *A. lappa* (Ueno *et al.*, 2011).

La 1-FEH de *H. tuberosus*, fue obtenida a partir de marcadores de secuencia expresadas (ESTs - Expressed Sequence Tags), a partir del secuenciamiento de fragmentos de ADNc complementarios al ARNm del gen putativo dentro del ARN total aislado (Xu *et al.*, 2015).

3.4. Modelamiento de las FEH

El secuenciamiento de genomas permite la inferencia de las secuencias de aminoácidos, pero un mayor conocimiento acerca del rol biológico de estas proteínas requiere del conocimiento de su estructura y función. Aunque los métodos experimentales determinan estructuras de alta resolución para muchas proteínas, los métodos computacionales de predicción proporcionan datos valiosos para la gran fracción de secuencias cuyas estructuras no se determinan experimentalmente. (Baker & Sali 2001).

El modelamiento de proteínas es una metodología útil para comparar proteínas de las que no se dispone su estructura definida, de manera predictiva permite generar un acercamiento de la estructura atómica de una secuencia de aminoácidos relacionándolas a estructuras conocidas de proteínas (usualmente homólogas – molde o plantilla). El modelado de una secuencia basado en estructuras conocidas consta de cuatro pasos: encontrar estructuras conocidas relacionadas con la secuencia que se va a modelar (es decir, plantillas), alinear la secuencia con las plantillas, construir un modelo y evaluar el

modelo. Entre las aplicaciones del modelamiento de proteínas podemos mencionar; el análisis del efecto de mutaciones; y la predicción de ligandos, actividades catalíticas entre otros. Su eficacia dependerá entonces de la calidad del modelo así como del grado de semejanza estructural con las estructuras de la plantilla a comparar. (Martí-Renom *et al.*, 2000).

La Figura 3.1 muestra cómo influye la calidad promedio de los modelos comparativos y determina sus aplicaciones. Desde supuestos en los que no se dispone de alguna plantilla semejante, podemos considerar la alternativa del modelado de novo (*ab initio*), aceptable para secuencias de alrededor de 100 aminoácidos, hasta estudios de mecanismos catalíticos que necesitan una mayor calidad, obtenida generalmente por difracción de rayos X y espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR).

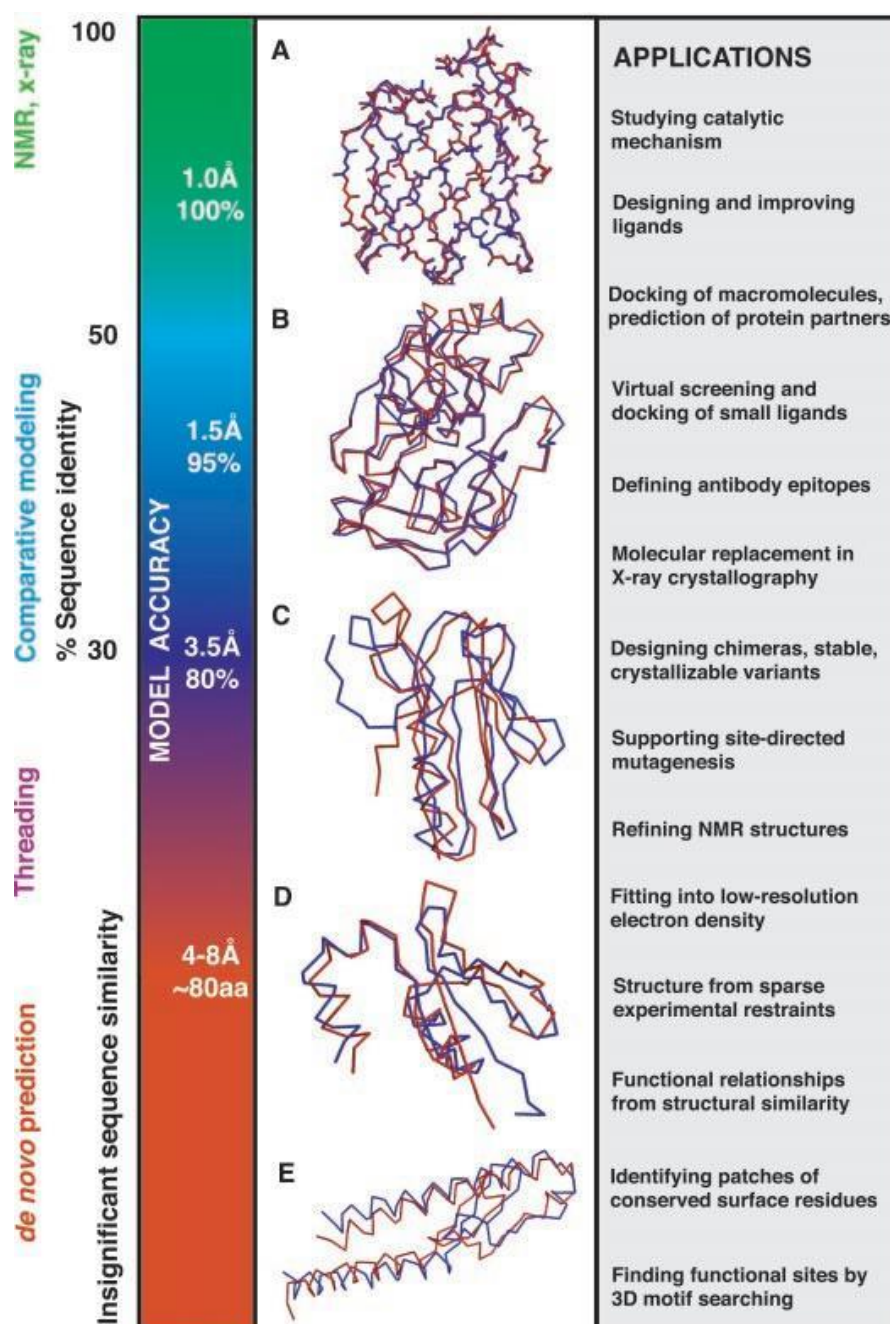


Figura 3.1. Posibles aplicaciones del modelado comparativo en función de los moldes usados. En rojo se muestra el esqueleto peptídico de los modelos, y en azul la estructura real. Fuente: Baker *et al.*, 2001.

La estructura de la isoenzima 1-FEH IIa de *Cichorium intybus* fue generada con una resolución de 2,35 Å°. Consiste en un dominio β-hélice de cinco pliegues N-terminal conectado a dos hojas β C-terminales. El sitio activo putativo se localiza enteramente en el dominio β-hélice y está formado por aminoácidos altamente conservados dentro de las

glicosil hidrolasas de la familia G-32. Se cree que el sitio de unión al fructano se encuentra en la hendidura formada entre los dos dominios (Verhaest *et al*, 2005).

4. METODOLOGÍA

4.1. Obtención del ARN total

Las raíces reservantes de yacón de las accesiones PER018279 y PER018283 fueron obtenidas de la estación experimental agraria “Baños del Inca” –Cajamarca, perteneciente al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). La cosecha de raíces reservantes para la extracción de ARN total se realizó en los meses de enero – marzo de 2016, donde la temperatura osciló entre 26 °C a 30 °C. Luego de la cosecha, las raíces fueron sometidas a un proceso de vernalización a 4 °C para inducir la producción de FEH antes de iniciar el proceso de extracción. Se tomaron como muestra porciones de raíces y discos de tejido de los brotes del rizósforo para el proceso de extracción. En este estudio fueron considerados cuatro métodos de extracción y purificación de ARN total.

4.1.1. Método del cloruro de litio (Verwoerd *et al.*, 1989)

Se congelaron en nitrógeno líquido 100 mg de tejido de la base del brote del rizóforo y se trituraron hasta polvo fino utilizando un pilón plástico preenfriado; se añadieron 15 µL de β-mercaptoetanol, 50 µL de ácido ascórbico 1M, y 1000 µL de buffer de extracción [fenol – 0.1M cloruro de litio 0.1M Tris HCl pH 8.0, 0.01M EDTA, 1% SDS (1:1)] previamente calentado (80 °C) homogeneizando por 30s. El tejido se colectó en un tubo de microcentrífuga de 2 mL y se adicionaron 250 µL de cloroformo – alcohol isoamílico (24:1) agitándose en un vortex. Se procedió a centrifugar la mezcla durante 10 minutos a 13000 r.p.m.

El sobrenadante fue recuperado cuidadosamente, agregándose cloruro de litio 4M (1:1), y dejando precipitar el ARN durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 15 minutos, el pellet se disolvió con 250 µL de ALN (ALN), agregándose luego 0.1 volúmenes de buffer acetato 3M pH 5.2, y 2.5 volúmenes de etanol absoluto para precipitar el ARN. Este material fue centrifugado a 13000 r.p.m. durante 20 minutos y se realizaron tres lavados del precipitado resultante con etanol al 70%. El precipitado se dejó secar al ambiente y finalmente se resuspendió en 50 µL de agua libre de nucleasas (ALN).

4.1.2. Método del bromuro hexadeciltrimetilamonio CTAB modificado (Lodhi *et al.*, 1994)

Se colocaron 100 mg de la base del brote del rizóforo en un mortero pre enfriado y se le agregaron 15 µL de β-mercaptoetanol , 50 µL de ácido ascórbico 1M y 1 mL de buffer CTAB (2% CTAB; 100 mM Tris-HCl, pH8.0; 20mM EDTA; 1.4M cloruro de sodio; 1.0% sulfito de sodio, 2.0% PVP-40), se trituroó con un pilón pre enfriado y se colectó el extracto macerado en un tubo de microcentrífuga de 2.0 mL. Este material fue centrifugado a 12000 r.p.m. por 5 minutos recuperándose con cuidado el sobrenadante, al cual se le agregó cloroformo - alcohol isoamílico (24:1) mezclándose vigorosamente. Nuevamente se centrifugó por 5 minutos a 12 000 r.p.m, recuperándose la fase acuosa. Se adicionó un volumen de cloruro de litio 5M, mezclándose suavemente y permitiendo que precipite durante toda la noche a 4 °C. El ARN se colectó luego de centrifugar a 13 000 r.p.m. por 20 minutos. El precipitado fue lavado dos veces utilizando 1 mL de etanol al 70 %. Finalmente se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió luego en 50 µL de ALN.

4.1.3. Método del Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

El Trizol es una solución caotrópica y la metodología de extracción está basada en el protocolo desarrollado por Chomczynski y Sacchi (2006).

Se colocaron 100 mg de la base del brote del rizóforo en un mortero pre enfriado y se le agregaron 15 μ L de β -mercaptoetanol, 50 μ L de ácido ascórbico 1M, y 1000 μ L de Trizol – Reagent (Invitrogen). Se trituró el material con un pilón pre enfriado y se colectó el homogenizado en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Se centrifugó por 10 min, a 12000 r.p.m. y a 4 °C, se recuperó el sobrenadante en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL agregándose 400 μ L de cloroformo, se agitó en vortex vigorosamente por 15 segundos, dejándose en reposo durante 15 min, a temperatura ambiente. Se procedió a centrifugar por 15 min, a 12 000 r.p.m., a 4 °C, se recuperó el sobrenadante, y se adicionó igual volumen de isopropanol para centrifugar seguidamente por 20 min, a 12 000 r.p.m., a 4 °C. El sobrenadante fue eliminado cuidadosamente para evitar el desprendimiento del precipitado el mismo que fue lavado 2 veces adicionando 1 mL de etanol al 70 % y centrifugando a 12 000 r.p.m. durante 3 minutos. El pellet se secó al ambiente y se resuspendió en 50 μ L de ALN.

4.1.4. Método de Columnas de purificación

Se colocaron 100 mg de la base del brote del rizóforo en un mortero pre enfriado y se le agregaron 15 μ L de β -mercaptoetanol, 50 μ L de ácido ascórbico 1M, y 450 μ L de buffer RLC (clorhidrato de guanidina), se trituró el tejido con un pilón pre enfriado. Se transfirió todo el lisado, aproximadamente 600 μ L, a la columna de separación que retiene los fragmentos gruesos de tejido dentro del primer tubo colector. Se procedió a centrifugar por 30 segundos a 12000 r.p.m. y se recuperó el sobrenadante transfiriéndolo a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Se agregó lentamente medio volumen de etanol absoluto, pipeteando suavemente para homogenizar, se añadió la suspensión a la siguiente columna

de separación que retiene el ARN, que se encuentra dentro del segundo tubo colector. Se procedió a centrifugar por 30 segundos a 12000 r.p.m., se eliminó el contenido del tubo colector, se adicionaron 700 µL de buffer RW1. se centrifugó por 30 segundos a 12000 r.p.m. agregándose luego 700 µL de buffer RLE¹, para centrifugar por otros 30 segundos a 12000 r.p.m.. El contenido del tubo colector fue eliminado, se centrifugó nuevamente durante 3 minutos a 12 000 r.p.m para secar la columna. Se adicionaron 50 µL de ALN a la columna y se colocó dentro de un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 mL, finalmente se centrifugó por 3 minutos a 12000 r.p.m., para coleccionar el ARN.

4.1.5. Diseño experimental

Se planteó un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA) con 8 tratamientos (Tabla 3.1) y 3 repeticiones por tratamiento.

Tabla 3.1. Tratamientos evaluados para extracción y purificación de ARN total.

Nº	Cod.	Tratamiento
1	<u>CILi 83</u>	<u>Accesión PER018283 + Método CILi</u>
2	<u>CTAB 83</u>	<u>Accesión PER018283 + Método CTAB</u>
3	<u>Trizol 83</u>	<u>Accesión PER018283 + Método Trizol</u>
4	<u>Qiagen 83</u>	<u>Accesión PER018283 + Método Columnas</u>
5	<u>CILi 79</u>	<u>Accesión PER018279 + Método CILi</u>
6	<u>CTAB 79</u>	<u>Accesión PER018279 + Método CTAB</u>
7	<u>Trizol 79</u>	<u>Accesión PER018279 + Método Trizol</u>
8	<u>Qiagen 79</u>	<u>Accesión PER018279 + Método Columnas</u>

Los datos de rendimiento de ARN total medidos en el nanodrop fueron analizados bajo los criterios de un diseño completamente aleatorio (Fernández, 2010). El modelo lineal del DCA está representado por: $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$,

¹ La composición de los buffers RW1 y RLE son desconocidos, se presume que contengan sal caotrópica en una concentración menor al buffer de lisis, de tal manera que permitan el lavado de la columna sin que el ARN se desprenda.

Donde Y es la observación en la unidad experimental (Repetición) a la que se le ha aplicado el tratamiento i ; μ es la media general del experimento; α es el efecto del tratamiento i y ε_{ij} es el efecto del error de la observación.

Se utilizó el método de comparación múltiple LSD Fisher para establecer diferencias entre las medias de los tratamientos.

4.2. Obtención de la secuencia de nucleótidos del ADNc de la FEH de yacón

Se diseñaron cebadores para las regiones de alta homología en genes de la FEH obtenidas en la base de datos de la EMBL; AIP90172_KM494975 y CAC19366_AJ242538 de (*C. intybus*), BAR88557_AB909128 (*A. lappa*) y AJW31155_KJ946352 (*H. tuberosus*).

La estrategia de trabajo se basó en la obtención de amplicones de ADNc sobrelapados que permitieron la cobertura de la secuencia de nucleótidos que codifican para la FEH, de yacón según se indica en la Figura 3.2.

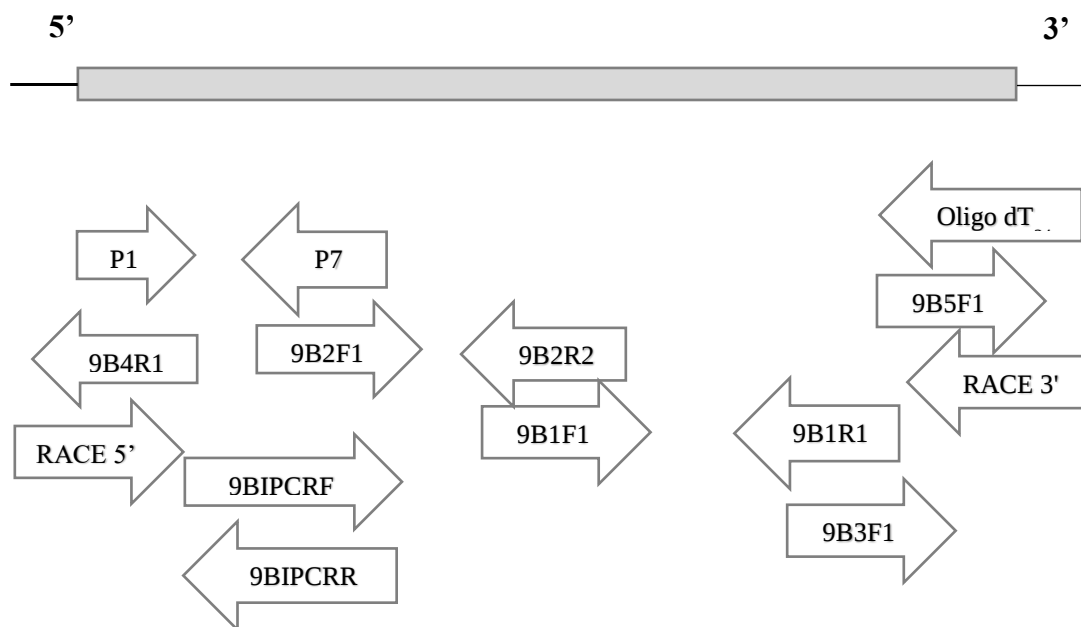


Figura 3.2. Estrategia para la obtención del ADNc que codifica para la FEH de yacón.

Tabla 3.2. Primers diseñados para la obtención del ADNc de la FEH de *S. sonchifolius*.

Nombre	Secuencia (5'-3')	N° de bases	Temperatura de hibridación (°C)
9B1F1	GGGARAAYTTYTTGCCRCA	19	47
9B1R1	GYTTCATMCTCCAAGCACTCAT	22	50
9B1R2	GGTCORAARCTCTCRATRYGAGTG	26	49
9B2F1	GGGGGGGATCGGGACAACAAC	21	65
9B2R1	COCTCKAYMGGOCAYTGRATYARCTG	26	56
9B2R2	COGRAAHGWCTGAAGVCCVGOCCA	24	61
9B3F1	GGYGORTTTTGTTGACATA	18	40
9B3R1	GGAATRMMAKDAYAAAGAATGA	22	40
9B4F1	COCTCDWTTMTYRYWTTATGTYTTC	25	51
9B4R1	TGGATTGTATTGGTAGAAGAAATGATA	27	52
9B5F1	GGCGTGTTGGCTATGGCGTCT	21	62
9B1PCRF	CCATCCTCCCGGAAACATT	20	57
9B1PCRR	TACCCGACCCAAGAAGCAGACAT	23	60

4.2.1. Obtención del ADNc por transcripción inversa

Se emplearon 5 µg de ARN total, 200 U de RTasa (Invitrogen Thermo Fisher Scientific), procediéndose de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se utilizó el cebador universal oligo dT₁₈. El producto fue mezclado con un volumen de Fenol – Cloroformo – Alcohol isoamílico (25:24:1) para su posterior purificación. Luego de separar las fases por centrifugación, la fase acuosa con el ADN fue transferida a otro tubo y precipitada con etanol absoluto para su posterior lavado con etanol al 70% y resuspensión en ALN.

4.2.2. Obtención de los amplicones del ADNc mediante PCR

El protocolo general para la PCR utilizada en este trabajo consistió en : Preparar una dilución 1/10 del ADNc, y usar 1 µL como molde; 0.2 µL de enzima Taq ADN pol (5U/µL), 5 µL de buffer 10X, 6 µL MgCl₂ (25mM), 1µL dNTPs (10mM), 1 µL primer forward (10 pmol), 1 µL primer reverse (10 pmol), hasta completar 50µL con ALN. Las condiciones de PCR fueron: 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 40 segundos, 45 segundos a temperatura de hibridación, según cada par de primers a usar

(Tabla 3.2), considerando la menor temperatura del par, 72°C durante 50 segundos y una amplificación final a 72 °C por 10 min. La visualización de los productos amplificados se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1 por ciento.

4.3. Obtención de las regiones no codificantes del ADNc de la FEH de yacón

4.3.1. Obtención del extremo 5' mediante la amplificación rápida de los extremos del ADNc (RACE)

A partir del ARN total purificado según el protocolo del CTAB descrito anteriormente, se generó el ADNc utilizando el kit RACE 5' v. 2.0 (Invitrogen), utilizando 5 µg de ARN total, Primer reverso 9B2R2 (20 pmol.), 1 µL DDT, 1 µL dNTP, completándose a un volumen de 20 µL con ALN. La mezcla seguidamente se incubó a 65 °C (5 minutos)) e inmediatamente se puso el tubo sobre hielo por 10 minutos, luego se adicionaron 6 µL de Buffer RT 5X, 1 µL de la RTasa, se completó hasta un volumen de 30 µL con ALN incubándose a 42° C por 50 minutos y la enzima se inactivó a 70°C durante 10 minutos. A la preparación anterior se le agregó 1 µL de ARNsa H incubándose por 30 minutos a 37° C. La enzima fue inactivada a 70 °C durante otros 10 minutos. Se purificó el producto de la transcripción inversa con fenol – cloroformo y precipitación con etanol al 70%.. Para adicionar la cola homopolimérica al ADNc se utilizaron 30 µL de ADNc, 9 µL del buffer 5X, 2 µL de dCTP (Desoxicitidina trifosfato) 2mM, 1 µL TdT (Desoxinucleotidil transferasa terminal) y 3 µL de ALN, incubándose a 37 °C por 15 minutos, inactivándose la enzima nuevamente a 70 °C durante 10 minutos. El producto fue sometido a una extracción fenol - cloroformo para su posterior purificación. Para la reacción de PCR se utilizaron 10µL del molde purificado, 1µL del primer forward (dG primer adaptador), 1µL del primer reverso (9B4R1) y 1 µL del primer 9B2R2; 0,3 µL de Taq DNA polimerasa (5U/ µL), 5 µL del buffer 10X, 4 µL de MgCl₂ (25mM), 1 µL de dNTPs

(10mM) llevándose a un volumen final de 50 μ L. Las condiciones de PCR fueron; 94°C durante 8 minutos, 50°C por 60 segundos y 15 minutos a 65°C, una segunda ronda a 94°C durante 5 minutos seguido de 35 ciclos de amplificación (94 °C durante 30 segundos, 50°C por 50 segundos, 68°C durante 2 minutos) y una extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados en gel de agarosa al 1 por ciento.

4.3.2. Obtención de los extremos 5' y 3' mediante la técnica de la PCR inversa (IPCR)

La IPCR se utiliza en la amplificación de fragmentos de ADN genómico que se encuentran fuera de los límites de la secuencia conocida. El procedimiento de esta técnica se utiliza también para caracterizar regiones en los clones procedentes de secuencias desconocidas de ADNc a partir de ARN total.

El ADNc se sintetizó por transcripción reversa a partir de ARN total extraído de las raíces de yacón según el protocolo descrito previamente, luego se obtuvo el ADN bicatenario por polimerización utilizando la *E. coli* ADN Polimerasa I a partir del molde de ADNc. El uso de la T4 ADN polimerasa permitió rellenar el extremo 5' dada su actividad exonucleasa 3-5', seguidamente se ligaron los extremos utilizando la T4 ADN ligasa. El ADNc circularizado se desnaturalizó mediante el calentamiento en baño maría. Finalmente, el ADNc circular se amplificó mediante el uso de los cebadores específicos 9BIPCRF y 9BIPCRR.

El ADNc fue obtenido utilizando 30 μ L de producto purificado de la RT-PCR 10 μ L del buffer 10X, 2 μ L de dNTP (10mM), 2.5 μ L de hexámeros randomizados y 1 μ L de *E. coli* ADN polimerasa I. La mezcla se llevó a un volumen final de 100 μ L con ALN incubándose a 15° C por 90 minutos, la enzima se inactivó a 70 °C durante 10 minutos.

Seguidamente se adicionó 1 μ L de T4 DNA polimerasa, incubándose a 11° C por 10 minutos y la reacción fue detenida adicionando 6 μ L de EDTA (0.5M). La ligación del ADNdc se realizó siguiendo el protocolo siguiente; 0.1 μ g de ADNdc, 10 μ L buffer 10X, 5 μ L de T4 ADN ligasa (1U/ μ L), se llevó el volumen a 100 μ L con ALN e incubó a 22 °C por 10 min, inactivándose la enzima a 70 °C durante otros 10 minutos. En cada paso la purificación del ADNdc se realizó a través del uso de fenol – cloroformo, centrifugación y precipitación con etanol absoluto con el lavado final con etanol al 70% y resuspension en ALN.

Para el desarrollo de la PCR final, se tomaron 10 μ L de una dilución 1/10 del ADNdc, 0.4 μ L de Taq DNA pol (5U/ μ L), 5 μ L de buffer 10X, 6 μ L cloruro de manesio (25mM), 01 μ L dNTPs (10mM), 1 μ L Primer forward (9BIPCRF SacI), 1 μ L Primer reverse (9BIPCRR PstI), completándose a 50 μ L con ALN. Las condiciones de PCR fueron: 94 °C por 8 minutos, 50°C por 60 segundos, 65 °C por 25 minutos y una segunda ronda comprendida por 35 ciclos de (94 °C por 40 segundos, 50 °C por 60 segundos, 68 °C por 2 min) y 72 °C por 10 min. Al término del tiempo la visualización de productos amplificados se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1 por ciento.

4.4. Preparación de clones para su secuenciamiento

4.4.1. Construcción de plásmidos recombinantes y transformación de

***Escherichia coli* DH5 α .**

Purificación de Insertos (productos de PCR). A cada tubo conteniendo el producto de PCR de interés, se agregó 1 volumen de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico 25:24:1., luego de agitar vigorosamente, se centrifugó a 12000 r.p.m. durante 8 minutos, recuperando el sobrenadante para agregar nuevamente cloroformo - isoamílico 24:1, en agitación vigorosa. Una siguiente centrifugación a 12000 r.p.m. por 8 minutos fue

realizada recuperando cuidadosamente el sobrenadante y agregando 0.2 volúmenes de acetato de amonio 10M junto con 3 volúmenes de etanol absoluto. Se dejó en reposo durante 1 hora a -20°C , para luego centrifugar a 14 000 r.p.m. por 20 minutos, eliminar con cuidado el sobrenadante y lavar el precipitado dos veces con 1 mL de etanol al 70%. Una centrifugación posterior a 14000 r.p.m. por 5 minutos seguida del descarte del sobrenadante permitió finalmente colocar el tubo boca abajo sobre un papel absorbente, para dejar secar el precipitado a temperatura ambiente. Se suspendió luego en 30 μL de ALN.

Ligación (pGEM Easy – PROMEGA). Los insertos purificados fueron ligados en el plásmido pGEM T Easy (Promega, USA), el cual presenta en los extremos una timina (T) terminal que facilita la recombinación dado que los productos de PCR amplificados con Taq Polimerasa presentan una adenina (A) terminal, por la actividad nucleotidil transferasa terminal de esta enzima.

En un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL se colocaron; plásmido pGEM T-Easy 0.5 μL , inserto (producto PCR) 20 ng/ μL 3.0 μL , Buffer 5X 5.0 μL , T4 ADN ligasa 1.0 μL , agua destilada 0.5 μL . La mezcla se dejó una noche a 4°C , y para detener la ligación se colocó el tubo durante 10 minutos a -20°C .

Protocolo de preparación y transformación de células competentes. Se obtuvieron células competentes de *E.coli* y fueron transformadas con los distintos plásmidos recombinantes. Las células competentes de *E. coli* DH5 α , fueron preparadas utilizando el método del cloruro de calcio (Sambrook *et al.*, 2001). El método de transformación de las células quimiocompetentes fue el de choque térmico de acuerdo a Sambrook *et al.* (2001).

En un tubo se colocaron: reacción de ligación 10 μL , células competentes 100 μL (descongeladas en el momento), la mezcla se mantuvo en hielo durante 30 minutos, y se

colocó en un termoblock a 42 °C por un minuto y medio, colocándolo inmediatamente sobre hielo durante 5 minutos. Se añadieron 600 µL de medio Luria-Bertani (LB) sin ampicilina, agitando a 37 °C, durante una hora. Se procedió a sembrar en placas con medio LB, X-Gal, IPTG con ampicilina, las siguientes cantidades: 50 µL, 100 µL, 200 µL . El material restante fue centrifugado a 5000 r.p.m. durante 2 minutos, se eliminó parte del sobrenadante, se resuspendió el pellet y se sembró en placas. El medio LB, X-Gal, IPTG y ampicilina contiene; 10 g de triptona, 10 g de NaCl y 5 g de extracto de levadura en un litro de agua, X-gal 40 µL (20mg/mL), IPTG 4.0 µL (40 mg/mL) y 50 µg/mL de ampicilina agregada al medio previo al plaqueado. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante toda la noche, el crecimiento bacteriano se detuvo luego colocando las placas a 4 °C.

4.4.2. Selección de colonias recombinantes (con el inserto)

La presencia de colonias de color blanco indican la presencia de una colonia bacteriana con el plásmido recombinante, esto se debe a que el inserto se introduce en una región dentro del gen LacZ impidiendo su normal transcripción, LacZ codifica el péptido α de la β -galactosidasa, esta enzima hidroliza el sustrato X-gal (bromo--cloro--indolil--D-galactopiranosido) y produce un pigmento azul. La enzima rompe el enlace glucosídico del X-gal, generando galactosa y un compuesto intermediario que se oxida constituyendo el pigmento azul. De esta manera se asume que las colonias de color azul probablemente no contienen el inserto.

Se dispusieron de tubos de ensayo de 10 x 150 mm, en cada uno se vertió 3 mL de medio líquido LB, los que fueron esterilizados previamente, se suplementó con ampicilina a una concentración final de 50 µg/mL previo a la siembra. Con ayuda de un tip de 10 µL se tocó suavemente la superficie de una de las colonias de color blanco, el cual se introdujo

en un tubo conteniendo el medio. Esto se realizó por triplicado. Los tubos fueron puestos a incubar a una temperatura de 37 °C y con agitación constante durante 24 horas, el crecimiento fue detenido sometiendo los tubos a 4 °C.

4.4.3. Extracción de plásmidos por lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 2001)

La transformación y multiplicación de bacterias con plásmidos recombinantes permite obtener una gran cantidad de plásmidos que contienen partes del gen de interés, el proceso cumple además la función de individualizar los fragmentos del gen, lo cual resulta útil cuando se analizan secuencias polimórficas (formas alélicas de un mismo gen). Adicionalmente se genera suficiente cantidad de plásmidos permitiendo un secuenciamiento con mayor fidelidad que cuando se secuencian productos de PCR.

El procedimiento a utilizar es el de lisis alcalina; para el cual se procede como sigue; del crecimiento bacteriano anterior verter 1.5 mL en un tubo de microcentrífuga, centrifugar a 5000 r.p.m. durante 2 minutos, eliminar el sobrenadante, repetir nuevamente con la cantidad restante, eliminar cuidadosamente el sobrenadante. Agregar 1/5 del volumen inicial de STE (Sucrosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM) frío, agitar hasta resuspender totalmente el pellet. Centrifugar a 5000 r.p.m. durante 2 minutos, eliminar completamente el sobrenadante, Adicionar al tubo lentamente 200 µL de Solución de lisis I (NaOH 0,2 M; SDS 1%), preparado recientemente, mezclar suavemente por inversión, mantener los tubos sobre hielo, agregar 150 µL de Solución de lisis II (acetato de potasio 1.32 M pH 4,8) pre enfriado, agitar suavemente por inversión, mantener sobre hielo por 15 minutos. Centrifugar a 14000 r.p.m. durante 8 minutos a 4 °C, colectar el sobrenadante procurando evitar tomar el precipitado, adicionar 2 volúmenes de alcohol absoluto, dejar reposar a -20 °C durante 30 minutos, centrifugar a 14000 r.p.m. durante 15 minutos, eliminar cuidadosamente el sobrenadante, agregar un mL de alcohol al 70 %, centrifugar

durante 5 minutos, repetir agregando 500 μ L de alcohol al 70 %. dejar secar el precipitado a temperatura ambiente. Disolver el precipitado en 42 μ L de TE conteniendo ARNasa A.

4.4.4. Purificación de plásmidos utilizando PEG

Este proceso de purificación permite obtener productos con mínima contaminación, lo suficientemente purificados para ser secuenciados.

A la preparación anterior se le agregaron 21 μ L de PEG 6000 40 %, cloruro de magnesio 30 mM. para una concentración final de 13 % PEG y 10 mM de cloruro de magnesio, se dejó reposar durante 2 horas, para ser centrifugada luego a 14000 r.p.m. durante 20 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante fue eliminado cuidadosamente y se agregó un mL de alcohol al 70 %, seguido de una centrifugación a 14000 r.p.m. durante 5 minutos, eliminando nuevamente el sobrenadante y se volvió a agregar 500 μ L de alcohol al 70 %. El pellet se dejó secar a temperatura ambiente, y fue resuspendido en 30 μ L de agua destilada estéril libre de nucleasas.

4.4.5. Preparación de plásmidos para secuenciamiento

Verificación de la presencia del inserto. La presencia del inserto se verificó por digestión enzimática con la enzima ***EcoRI***, que corta al vector utilizado (PGEM T-easy) en dos lugares dentro del sitio de clonación múltiple. El corte con esta enzima libera al inserto lo que permite visualizar dos fragmentos uno de 3 kb correspondiente al vector y otro del tamaño del producto de la PCR.

Ajuste de la concentración previa al secuenciamiento. La concentración en ng/ μ L de cada preparación de plásmido purificada fue cuantificada en el nanodrop. Usando 3 preparaciones procedentes de tres colonias recombinantes y de cada preparación, se tomaron 2 alícuotas de 20 μ L cada una a una concentración de 100 ng/ μ L, éstas fueron enviadas a secuenciar (Macrogen, California, USA) en ambos sentidos utilizando los

primers que corresponden a las secuencias de los promotores T7 y Sp6 del vector PGEM T-easy.

4.5. Análisis filogenético de la FEH de yacón

4.5.1. Edición de secuencias y búsqueda de homologías

Las secuencias recibidas fueron editadas utilizando el software Seqman y Editseq (DNA Star, Lasergene 11). La secuencia de nucleótidos de la accesión obtenida fue traducida a aminoácidos, siguiendo el código estándar, utilizando el programa Transeq (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/transeq/>).

La búsqueda de secuencias homólogas de aminoácidos en la base de datos EMBL (European Molecular Biology Laboratory), se realizó utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990).

El ordenamiento de las secuencias en formato Pearson / Fasta, se realizó utilizando el programa Readseq biosequence conversion tool, accesible a través de la página web <http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/readseq/>.

4.5.2. Alineamiento múltiple de las secuencias

El alineamiento múltiple de aminoácidos, se realizó utilizando el programa ClustalX 2.0 considerando los parámetros predeterminados en el programa.

4.5.3. Cálculo del porcentaje de identidad de nucleótidos y aminoácidos

El cálculo de la identidad entre secuencias de aminoácidos de las FEHs de las accesiones seleccionadas y la secuencia 9B de yacón fue realizada con el programa MEGA 11, se utilizó el método de la p-distancia, considerando los parámetros predeterminados del programa. Se eliminaron todas las posiciones ambiguas de cada par de secuencias (opción de eliminación por pares) (Tamura *et al.*, 2021).

4.5.4. Construcción del árbol filogenético

La construcción del árbol filogenético se realizó utilizando el programa MEGA 11, empleándose el modelo estadístico de máxima probabilidad ML y utilizando como modelo de sustitución el de WAG (Whelan *et al.*, 2001).

La validación del árbol filogenético, se efectuó mediante el Método de remuestreo – Bootstrap (Felsenstein, 1985) con 2000 repeticiones. Normalmente se realizan más de 1000 pseudoréplicas y se calcula cuántas réplicas agrupan los clusters considerando éstos como valores de confianza del nodo del clúster. Los nodos con valores de confianza bajos (<50) se colapsan indicando que la filogenia de dicha rama no está clara.

4.6. Modelamiento de la enzima 1-FEH de *S. sonchifolius*

La secuencia parcial de la 1-FEH de *S. sonchifolius* (9B) obtenida en el trabajo experimental, fue completada *in-silico*, mediante el alineamiento con las secuencias hipotéticas de la 1-FEH de *S. sonchifolius* depositadas por Fan *et al.* (2022) en la base de datos NCBI y EMBL.

Para obtener un modelo por homología estructural de la FEH en yacón se emplearon los programas : SWISS MODEL (Waterhouse *et al.*, 2018) , PyMOL (Shrodinger, 2015) y Alpha Fold 3 (Abramson *et al.*, 2024). Con el programa Swiss Model se alinearon la secuencia de aminoácidos resultante de este estudio con otras de alta identidad tomando como referencia la estructura cristalizada de la 1-FEH de *C. intybus* (1ST8). Si bien la secuencia obtenida en este trabajo presentó más homología y semejanza con la 1-FEH de *H. tuberosus*, no fue posible modelarla con ésta al no encontrarse en la base de datos PDB. La validación de la calidad de la estructura fue realizada con el programa Swiss Model, Alpha Fold 3 y el servidor PROCHECK para realizar el diagrama de Ramachandran (Ramachandran *et al.*, 1963)

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. Desarrollo del protocolo de extracción del ARN total a partir de raíces de yacón

Las raíces reservantes de yacón por su naturaleza presentan altas cantidades de polisacáridos que hacen que el macerado sea de consistencia mucilaginosa, además de la presencia de sustancias fenólicas que provocan una rápida oxidación de los extractos, esto motivó la necesidad de optimizar un protocolo de purificación de ARN total con un buen rendimiento y de una adecuada calidad que pueda ser usado como sustrato para las reacciones de obtención de ADNc . Los tratamientos de extracción de ARN total realizados con dos accesiones de yacón mostraron diferencias significativas siendo los métodos CTAB y de cromatografía en columnas de sílice (Qiagen) los más adecuados en cuanto al rendimiento en ng/μL, el valor del pico de absorbancia (A 260/280) y en la calidad observada en la visualización de bandas en gel de agarosa.

Tabla 3.3. Comparación de Métodos de Extracción de ARN total a partir de raíces de yacón

Tratamiento	Repeticiones	Media *	Agrupamiento		
CTAB 79	3	129.13	A		
Qiagen 83	3	127.6	A		
CTAB 83	3	118.73	A	B	
Qiagen 79	3	109.7	A	B	
CiLi 79	3	95.62	A	B	C
Trizol 79	3	89.17	A	B	C
Trizol 83	3	80.1		B	C
CiLi 83	3	59.75			C

* Promedio del rendimiento de ARN total en ng. de cada método de extracción utilizado en las dos accesiones de yacón PER018279 (79) y PER018283(83). Comparaciones de medias LSD Fisher, nivel de confianza 95%

En la Tabla 3.3 se observa que los métodos de extracción (tratamientos) CTAB y Qiagen, son significativamente diferentes en relación con los otros métodos, independientemente de la accesión de yacón utilizada. También se encontraron diferencias significativas entre los métodos Trizol y CILi, si la accesión utilizada fue la PER018283 de yacón.

Las raíces reservantes de *S. sonchifolius* son ricas en polisacáridos, éstos usualmente dificultan el proceso de purificación de ácidos nucleicos, al formarse compuestos mucilaginosos cuando se combinan con una sal caotrópica, como la guanidina isotiocianato, base de las formulaciones del Trizol (Invitrogen) y del buffer RLT (Qiagen). En el caso de este último fabricante, el kit comercial de extracción y purificación de ARN utilizado, dispone además de un segundo buffer cuya base es el clorhidrato de guanidina (RLC), el cual es recomendado en muestras de tejidos con alto contenido de polisacáridos. El uso de detergentes catiónicos como el CTAB, en condiciones de alta concentración de sal forma complejos con polisacáridos y proteínas, permaneciendo los ácidos nucleicos en suspensión, su uso es común en distintos laboratorios como base del proceso de purificación de ácidos nucleicos, la adición de cloruro de litio a alta molaridad determina la precipitación selectiva del ARN, mientras el ADN permanece en suspensión, permitiendo su separación, el buffer de extracción fue calentado a 80 °C previamente a su uso, previniendo la formación de mucílago y facilitando la homogenización del extracto. El método del cloruro de litio tiene como desventaja su bajo rendimiento (Tabla 3.3), si bien el cloruro de litio se comporta como caotropo, su acción parece no ser tan efectiva como el CTAB y el clorhidrato de guanidina, aunque haciendo modificaciones en el contenido del buffer de extracción (relación SDS-CILi) ayudan a mejorar los resultados en muestras recalcitrantes (Vennapusa *et al.*, 2020). La formación del mucílago se acentuó cuando la muestra fue trabajada a baja temperatura (nitrógeno líquido). La

extracción de ARN a partir de matrices de polisacáridos (quitosano y agarosa) ha sido satisfactoria mediante el uso del CTAB, en relación al uso de isotiocianato de guanidina (Wang y Stegemann., 2010).

El uso combinado de ácido ascórbico y β -mercaptoetanol dio mejor resultado para evitar la oxidación de los extractos que el uso de cualquiera de los dos por separado, el ácido ascórbico ha sido utilizado en muestras de tejido con alto contenido de polifenoles como es el caso del haba (*Vicia faba*), en extracciones de ARN total de hojas con infección de BBMV – Broad Bean Mottle Virus (Romero *et al.*, 1993).

5.2. Obtención del ADNc de la FEH de yacón

Como resultado de este trabajo experimental se obtuvo un ADNc con una secuencia de nucleótidos que codifica para 516 aminoácidos con 292 nucleótidos en la región no codificante 3' lo que correspondería al 85% de la estructura de la proteína y esta información fue publicada (Moreno *et al.*, 2019). De acuerdo a lo reportado por Fan *et al.* (2022), con la secuenciación del genoma de yacón, el gen putativo de la FEH de *S. sonchifolius* (KAI3756050.1) codifica para 603 aminoácidos y esta proteína tiene veintidós aminoácidos más que las FEHs reportadas de las otras asteráceas en su extremo amino-terminal . Probablemente esta diferencia se deba a la presencia de una secuencia péptido señal, removida de manera postraducciona para dar origen a una enzima FEH de yacón madura, de acuerdo a lo observado por Van den Ende *et al.* (2000) en la 1-FEH I de *C. intybus*. Los autores, comparando la secuencia de aminoácidos derivada del ADNc con la secuencia N-terminal de la enzima 1-FEH madura de la achicoria observaron que el producto de la traducción primaria tiene un péptido señal de 31 aminoácidos que se elimina postraduccionalmente. Tomando esta información, la proteína FEH funcional de yacón podría tener un total de 581 aminoácidos como producto de la traducción primaria

del ADNc removiendo un posible péptido señal de veintidós aminoácidos. Sin embargo, esta funcionalidad se comprobaría realmente con la expresión heteróloga de la proteína.

El alineamiento de secuencias mediante el algoritmo blast (ClustalX 2.0) entre la secuencia parcial de la 1-FEH de yacón obtenida en este estudio y la secuencia de yacón KAI3756050.1 depositada en la base de datos (NCBI, EMBL-EBI) por Fan *et al.*, 2022 permitió generar *in-silico* la región faltante, resultando en una secuencia adicional de 87 aminoácidos (Figura 3.3). El alineamiento mostró una similitud de 99.34 %, un E-valor cercano a 0 y el mayor valor (total score), en relación a las otras secuencias evaluadas (datos no mostrados).

```

Yacón FEH -----
KAI3756050.1  MDPHPIHYTPPLLLDNLKTYIMNKPLSSFLTLCFLVLVYHTLISNATGRSLIDGILLPT
Yacón FEH -----LYQGVYHFFYQYNPYAATFGTIVWGHA
KAI3756050.1  QKNEQPYRTGYHFQPPSNWMNDPNGPMLYQGVYHFFYQYNPYAATFGTIVWGHA
*****

```

Figura 3.3. Alineamiento parcial de las secuencias Yacón y KAI376050.1 (Fan *et al.*, 2022), indicando la región *in-silico* agregada (en rojo) y el motivo WMNDPNG que contiene.

En la Figura 3.4 se muestra la secuencia de 603 aminoácidos de la 1-FEH de yacón que combina los resultados obtenidos en el presente trabajo experimental y los 87 aminoácidos (en amarillo) agregados *in silico* a partir de la publicación de Fan *et al.* (2022) . En este gráfico se muestran además los motivos conservados de la familia de glucosil hidrolasas GH-32 y los sitios probables de glucosilación.

MDHPHHIYTPPLLLDNLKTYIMNKPLSSFLTLCFLVLVYHTLSNATGRSLIDGILL
PTQKNEQPYRTGYHFQPPSNWMNDPNGPMLYQGVYHFFYQYNPYAATFGTIVW
GHAVSYDLVNWIHLDPAIYPTQEAIDNSCWSGSATILPGNIPAMLYTGSDSNSRQV
QDLAWPKNLSDPFLREWVKYAGNPIITPPAGVKDDCFRDESTAWLGPDGWVRIV
VGGDRDNGMAFLYQSTDFVNWTRYEQFLASADATGTWECPEFFFPVPLNSTINGL
DTSAYSGNVMHVMKAGFEGHDWYTIGTYSPDRENFLPQNGKLSGSTLDLRYD
YQGFYASKSFYDDSKNRRVLWAWVPETDSQEDDIEKGWAGLQSFPRAIWIDGSG
KQLIQWPVEEIESLRGNEVKLQNKKLTSGTVVEIQGVTSQADVTISFKLEDLKEA
EVLDTSSSDVPQVLCTERGASSKGAFGPFGVLAMASKDLKEQTAIFRFRVFNQNG
RYSVLMCSDLRSRSTVRSNIDTTSFGAFVDIDPRYNEISLRNLIDHSIESFGAGGKTC
TTSLIYPKFLTYEDAHLEAFNNGTQSVKISQMSAWSMKNAEFVIDQVKSAA 1

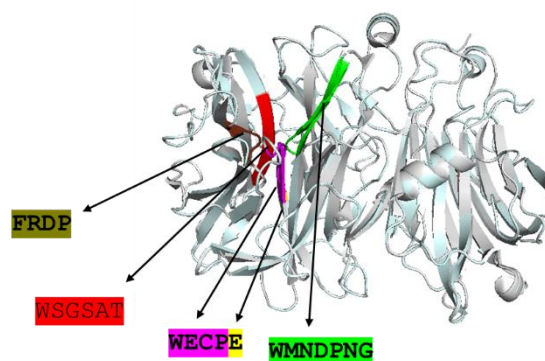


Figura 3.4 Secuencia de aminoácidos predicha de la enzima fructano exohidrolasa (1-FEH) de yacón mostrando los motivos funcionales en color y los sitios probables de glicosilación subrayados.

5.2.1. Distancia de la secuencia FEH de yacón en relación a otras fructano exohidrolasas

La Tabla 3.4 muestra las distancias que existen entre las secuencias de las distintas FEHs de las plantas que acumulan fructanos y la secuencia de aminoácidos de yacón obtenida en este trabajo. En esta tabla se incluye la secuencia hipotética de 1-FEH II de yacón (KAI3756050.1), obtenida por Fan *et al.* (2022), a partir del secuenciamiento del genoma completo de *S. sonchifolius* publicado años después de realizado el presente trabajo. La secuencia de yacón muestra una identidad de 99.34% en el alineamiento con esta secuencia KAI3756050.1. Con otra secuencia hipotética (KAI3804658.1) del mismo estudio, muestra una identidad de 94.19 % siendo probablemente una forma alélica de la misma 1-FEH II. Se observa también una identidad de la secuencia de aminoácidos de *S. sonchifolius* con dos beta-fructofuranosidasas de *H. annuus*, (88.10 y 88.37 %), y presenta además un 87.41 % de identidad con la 1-FEH de *H. tuberosus*. Con las 1-FEH IIa y 1-FEH II b de *C. intybus* un 85.34 y 85.62 % respectivamente, lo que indica una

mayor identidad relativa con la 1-FEH-IIb. Los valores de identidad entre las secuencias de aminoácidos homólogas y la secuencia obtenida en este estudio otorgan indicios para asegurar que la proteína corresponde a una 1-FEH II de yacón.

Tabla 3.4. Porcentajes del Identidad (p-distancia) entre la secuencia de aminoácidos de la FEH de yacón y otras 1-FEH relacionadas.

	FEH <i>Smallanthus sonchifolius</i>	XP_022029019.1_beta-fructofuranosidase_CWINV6-like <i>Helianthus annuus</i>	XP_022029020.1_beta-fructofuranosidase_CWINV3-like <i>Helianthus annuus</i>	AIP90174.1_fructan_1-exohydrolase_IIb_ <i>Cichorium intybus</i>	AJW31156.1_fructan_1-exohydrolase_ <i>Helianthus tuberosus</i>	AAP85536.1_fructan_1-exohydrolase_IIa_ <i>Cichorium intybus</i>	CAJ77148.1_putative_fructan_1-exohydrolase_part_ <i>Vernonia herbacea</i>	XP_024963394.1_beta-fructofuranosidase_CWINV6-like <i>Cynara scolymus</i>	KAE8820631.1_Fructan_1-exohydrolase_ <i>Hordeum vulgare</i>	XP_021754540.1_fructan_6-exohydrolase-like <i>Chenopodium quinoa</i>	AFA46812.1_cell_wall_invertase_ <i>Manihot esculenta</i>	NP_001268208.1_cell_wall_apoplastic_invertase_ <i>Vitis</i>	KAI3756050.1_hypothetical_protein_L1987_55863_ <i>S. sonchifolius</i>	KAI3804658.1_hypothetical_protein_L1987_26367_ <i>S. sonchifolius</i>
FEH <i>Smallanthus sonchifolius</i> (este estudio)														
XP_022029019.1_beta-fructofuranosidase_CWINV6-like <i>Helianthus annuus</i>	88.10													
XP_022029020.1_beta-fructofuranosidase_CWINV3-like <i>Helianthus annuus</i>	88.37	99.81												
AIP90174.1_fructan_1-exohydrolase_IIb_ <i>Cichorium intybus</i>	85.62	83.02	85.08											
AJW31156.1_fructan_1-exohydrolase_ <i>Helianthus tuberosus</i>	87.41	97.42	97.87	81.80										
AAP85536.1_fructan_1-exohydrolase_IIa_ <i>Cichorium intybus</i>	85.34	82.59	84.30	96.19	81.38									
CAJ77148.1_putative_fructan_1-exohydrolase partial_ <i>Vernonia herbacea</i>	83.54	81.63	82.85	83.48	81.11	84.26								
XP_024963394.1_beta-fructofuranosidase_CWINV6-like <i>Cynara scolymus</i>	83.16	81.08	81.98	82.23	79.51	81.80	81.01							
KAE8820631.1_Fructan_1-exohydrolase_ <i>Hordeum vulgare</i>	46.31	46.62	48.34	45.55	46.97	45.31	45.38	45.55						
XP_021754540.1_fructan_6-exohydrolase-like <i>Chenopodium quinoa</i>	54.42	55.00	54.39	53.86	54.62	54.32	54.13	53.93	48.46					
AFA46812.1_cell_wall_invertase_ <i>Manihot esculenta</i>	51.40	52.82	54.17	52.57	52.46	52.46	52.74	51.60	48.08	66.02				
NP_001268208.1_cell_wall_apoplastic_invertase_ <i>Vitis</i>	51.57	52.11	53.57	51.50	51.94	51.23	52.21	51.06	48.78	64.47	72.92			
KAI3756050.1_hypothetical_protein_L1987_55863_ <i>S. sonchifolius</i>	99.34	88.10	88.37	85.44	87.41	85.17	83.71	83.16	46.31	54.23	51.40	51.57		
KAI3804658.1_hypothetical_protein_L1987_26367_ <i>S. sonchifolius</i>	94.19	86.90	87.40	84.06	86.21	83.62	82.67	81.42	46.91	54.81	51.57	51.75	93.85	

5.2.2. Filogenia de la FEH de yacón

La secuencia de la FEH de yacón dentro de la topología generada (árbol sin raíz) del análisis de algunas secuencias de fructano exohidrolasas, muestra que esta enzima pertenece a un clado en el cual se encuentran las 1-FEH del género *Helianthus*, los valores de Bootstrap en las bifurcaciones respaldan su división. El árbol filogenético revela que las FEHs no forman un único grupo monofilético, sino que están entrelazadas con las invertasas de pared celular (CWINs). Asimismo se aprecia que las FEHs han evolucionado de forma independiente al menos en tres ocasiones a partir de las invertasas de pared celular. Se observa un primer clado formado por las FEHs de *Helianthus tuberosus* y *Smallanthus sonchifolius* estrechamente relacionado con una CWINV de *Helianthus annuus*. Un segundo clado agrupa la FEH de *Vernonia herbacea* (otra Asteraceae) con una CWINV de *Cynara scolymus* (también Asteraceae), representando un segundo origen independiente de la actividad FEH dentro de la misma familia botánica. El tercer clado incluye la FEH de *Hordeum vulgare* (Poaceae) agrupada con otras CWINs, lo que demuestra un tercer origen independiente. Las enzimas se agrupan principalmente según su relación taxonómica y su especificidad de sustrato (1-FEH vs 6-FEH), más que por la función FEH en sí misma.. Las secuencias de 1-FEH de diferentes géneros (como *Hordeum*, *Helianthus*, *Cichorium*, *Vernonia*) están agrupadas más cerca de las CWINs de su propia familia botánica que de las 1-FEH de otras familias. Los géneros *Smallanthus* y *Helianthus* pertenecen a la subfamilia Asteroideae, más distante de la sub familia Cichorioideae (*Cichorium*, *Vernonia*, entre otras), relacionadas entre sí y más distante de la FEH de *H. vulgare* (secuencia de grupo externo). Para el género *Cichorium* (achicoria), hay dos isoformas (1-FEH IIa y 1-FEH IIb). En el árbol, estas dos secuencias son grupos hermanos, formando un pequeño clado muy cercano, lo que indica que surgieron por una duplicación génica relativamente reciente en la evolución de este

género. Todo esto indica que la capacidad de hidrolizar fructanos de las fructano exohidrolasas surgió de forma independiente en diferentes linajes de plantas a través de una nueva función de genes de invertasa duplicados, lo se encuentra respaldado por diferentes estudios (Ritsema y Smeekens 2003a; Le Roy *et al.*, 2007a; Van den Ende, 2022)

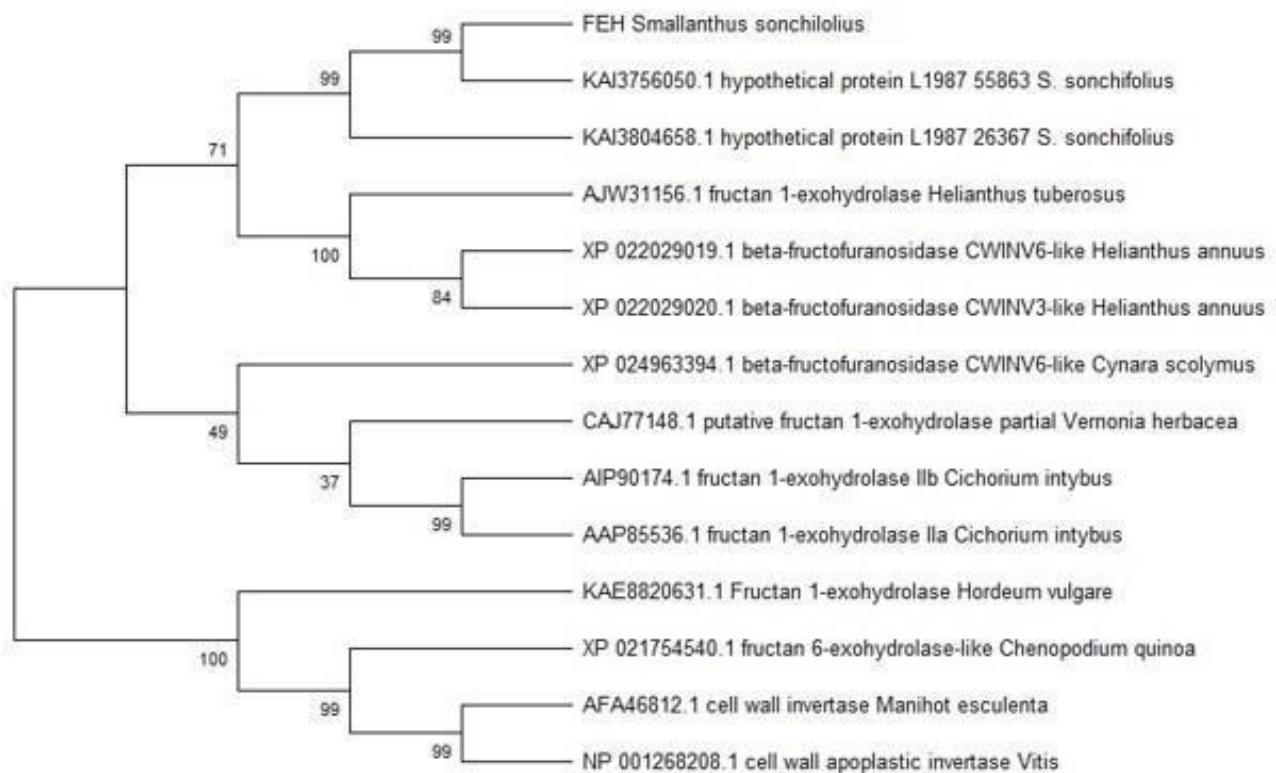


Figura 3.5. Árbol filogenético de la FEH de *Smallanthus sonchifolius* comparada con otras secuencias de fructano exohidrolasas.

La filogenia fue inferida utilizando el método de Máxima Verosimilitud y el modelo de Whelan y Goldman [Whelan *et al.*, 2001]. La validación por el método de remuestreo (Bootstrap) se dedujo a partir de 2000 réplicas. Se indica el porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de remuestreo (Felsenstein, 1985). Se utilizó una distribución Gamma discreta para modelizar las diferencias de tasa evolutiva entre sitios (5 categorías (+G, parámetro = 2,70 e +I = 0,24).

Se eliminaron todas las posiciones que contenían lagunas y datos ausentes (supresión completa), el análisis filogenético se realizó utilizando el programa MEGA12 [Tamura *et al.*, 2021].

5.3. Modelamiento por homología estructural

5.3.1. Predicción de la estructura de la FEH de yacón

La estructura tridimensional de la proteína de la FEH de yacón generada a partir de la secuencia de aminoácidos fue obtenida utilizando como plantilla la 1-FEH IIa de *C. intybus* 1ST8, depositada en la base de datos del Protein Data Bank (PDB). Si bien la secuencia de yacón, está más relacionada con las FEH del género *Helianthus*, no se tiene determinada experimentalmente su estructura tridimensional (cristalización), por lo que no están incluidas en la base de datos de la PDB. La estructura tridimensional de la FEH 1ST8 presenta una región N-terminal formada por un dominio β -hélice quintuple, con cuatro cadenas bilaterales antiparalelas cada una mostrando una “W” como topología clásica en torno a un eje central, rodeando una cavidad del sitio activo cargada negativamente (Figuras 3.6A y 3.6B); Se ha propuesto que esta cavidad desempeña un papel en el reconocimiento de sustratos de fructanos de mayor grado de polimerización (Le Roy *et al.*, 2008). La región carboxiterminal (C- terminal) está formada por dos hojas β con seis cadenas antiparalelas formando un pliegue tipo “sándwich” y dos alfa hélices, aunque la función exacta de este módulo aún no está clara, Altenbach *et al.* (2004), demostraron que es esencial para la estabilidad general de la proteína. Estas características presentes en la estructura predicha de la 1-FEH de *S. sonchifolius*, son propias del clan GH-J (GH-32 y GH-68) (Hettwer *et al.*, 1998, Nurizzo *et al.*, 2002; Pons *et al.*, 2004).

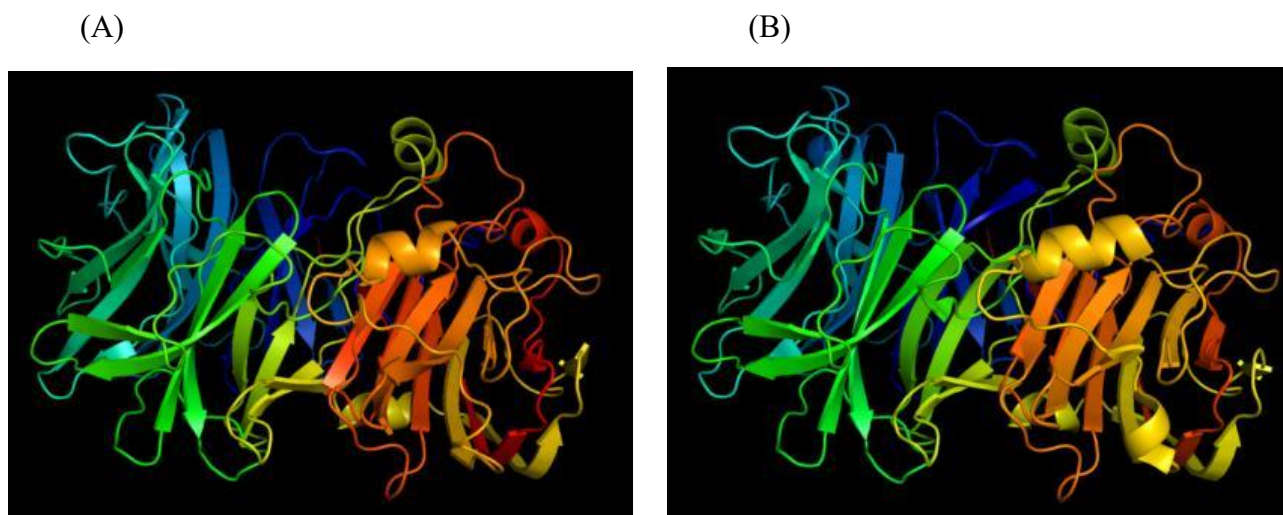


Figura 3.6. Estructura predicha de la FEH de *S. sonchifolius* (A), comparada con la 1-FEH Ila de *C. intybus* 1ST8 (B), (Swiss-model expasy), generada con Pymol.

La validez de la estructura predicha a partir de la secuencia del gen putativo de la 1-FEH de yacón, se basó en los valores; GMQE, QMEANDisCo Local, y QMEAN Z-Scores (Swissmodel.expasy.org) y en el análisis de la calidad estereoquímica de PROCHECK (Anexo 7)

El estimado de calidad local muestra un valor para cada residuo del modelo (diana) versus la expectativa de similaridad de la estructura nativa (plantilla). La puntuación global de QMEANDisCo es la puntuación promedio por residuo, y la estimación del error proporcionada se basa en las puntuaciones globales de QMEANDisCo estimadas para un amplio conjunto de modelos, representando la desviación estándar entre la puntuación global de QMEANDisCo para la estructura propuesta y las diferencias en las distancias interatómicas por pares entre el modelo y la estructura de referencia sobre una base atómica completa (Studer *et al.*, 2020). Los residuos que muestran un valor debajo de 0.6 son considerados de baja calidad. La puntuación QMEANDisCo del modelo propuesto para la 1-FEH de *Smallanthus sonchifolius* fue de 0.91 ± 0.05 (Anexo 7.1). La puntuación GMQE (Estimación global de la calidad del modelo) de 0.87 para la estructura predicha de yacón, estima la precisión de la estructura terciaria del modelo resultante, combinando

propiedades de la alineación objetivo-plantilla y la estructura de la plantilla. El GMQE está disponible antes de construir un modelo real y, por lo tanto, es útil para seleccionar plantillas óptimas para el problema de modelado en cuestión. GMQE y QMEANDisCo global proveen una estimación general de calidad de la estructura predicha que varía en el rango de 0 y 1, a mayor valor una mayor calidad esperada. GMQE radica en la cobertura, QMEANDisCo, evalúa el modelo, sin dependencia de la cobertura. Ambos valores 0.91 ± 0.05 y 0.87 respectivamente son mayores de los valores críticos mínimos y más cercanos a 1 por lo que el modelo predicho de la FEH resulta válido.

Respecto al análisis de la calidad estereoquímica del modelo de proteína 1-FEH de yacón, refinado y validado mediante Alpha Fold 3, se obtuvo el Diagrama de Ramachandran con 88.3% de residuos en regiones permitidas y 0.2% en regiones no permitidas correspondiente al residuo H538. (Anexo 7.2). Dado que este aminoácido no se encuentra cercano a los motivos de importancia de la enzima, es posible que no interactúe con aminoácidos críticos para su función.

5.3.2. Residuos de aminoácidos en los sitios activos

La secuencia de aminoácidos de la FEH de yacón obtenida muestra los tres motivos principales altamente conservados presentes en las FEH de la familia de glucósido hidrolasas GH32, en ellos se encuentran tres grupos de aminoácidos WMNDPNG, RDP y WEC (resaltados en la figura 3.4) denominados triada catalítica (Lammens *et al.*, 2009), comunes en otras especies de asteráceas como *C. yntibus*, *V. herbácea*, *H. tuberosus*, entre otras.

El motivo WMNDPNG (motivo β -fructosidasa o caja de unión a la sacarosa), abarca los residuos 78-85 de la cadena polipeptídica de la secuencia del gen tentativo de la 1-FEH de *S. sonchifolius*, este motivo es conservado en las invertasas ácidas de tipo vacuolar y

de pared celular, pero es variable en las enzimas biosintéticas de los fructanos vegetales (Ritsema *et al.*, 2004, 2006). Recientes trabajos de estructura-función revelaron que dos aminoácidos críticos (W y N) en este motivo son importantes para el desarrollo de la capacidad de transfructosilación (Schroeve *et al.*, 2008), el aspartato **D-82** (Figura 3.7) vendría a ser el aminoácido nucleófilo en el caso de la FEH de *S. sonchifolius* y por analogía (Lammens *et al.*, 2008), parte del motivo responsable de la unión al fructano.

En el motivo RDP, residuos 205 – 207 en la secuencia de *S. sonchifolius*, el aspartato **D-206** (Figura 3.7) actúa presumiblemente como donante de protones, desempeñando un papel crucial en el mecanismo catalítico (Verhaest *et al.*, 2005).

El motivo WEC ocupa los residuos 259 - 261, en el cual el catalizador ácido/base está representado por el glutamato **E-260** (Figura 3.7), el cual aparentemente no está involucrado en el mecanismo catalítico, y actuaría como estabilizador del estado de transición en la reacción de transfructosilación (Reddy *et al.*, 1996).

Ensayos de mutagénesis dirigida en los motivos conservados mencionados previamente, en genes homólogos de la 1-FEH de otras especies confirman el rol de estos aminoácidos en la actividad de la enzima para el mecanismo catalizador en la hidrólisis del enlace glucosídico (Reddy y Maley., 1990, 1996; Batista *et al.*, 1999).

Otro motivo conservado y de importancia dentro de los miembros de la familia GH32 es WSGSAT, presente también en la secuencia de yacón (141 – 146). Muchas FEHs carecen de un triptófano en este motivo, y muestran una fenilalanina (F), que tiene un carácter menos hidrofóbico en esta posición. (Verhaest *et al.*, 2007).

Es importante mencionar, que el residuo W82 en 1-FEH IIa en *C. intybus* muestra una orientación marcadamente diferente en comparación con W82 de AtcwINV1 (*Arabidopsis*) y todos los demás equivalentes estructurales conocidos: F102 en la exo-

inulinasa fúngica (Nagem *et al.*, 2004), W163 y W224 en las levansucrasas (Meng y Fütterer, 2003; Martínez-Fleites *et al.*, 2005), y F74 en la β -fructosidasa bacteriana (Alberto *et al.*, 2004). La orientación de F102/W163/F74 está limitada por el apilamiento con Y131/F182/Y92. En la 1-FEH IIa, sin embargo, W82 (W111 en este estudio) no se apila con un residuo aromático, en su lugar, se encuentra un pequeño residuo de serina (S101). Experimentos de mutagénesis demostraron que los mutantes W82L y S101L ya no son inhibidos por la sacarosa, mientras que las enzimas que son fuertemente inhibidas por la sacarosa contienen un equivalente de serina o glicina (Verhaest *et al.*, 2007; Le Roy *et al.*, 2008). Al parecer, la sacarosa no puede unirse en una configuración de sustrato estable en las FEH. Lo más probable es que los residuos más pequeños, como la glicina y la serina, permitan una posición diferente del W82 y la unión alternativa de la sacarosa en una configuración inhibidora (Lammens *et al.*, 2009).

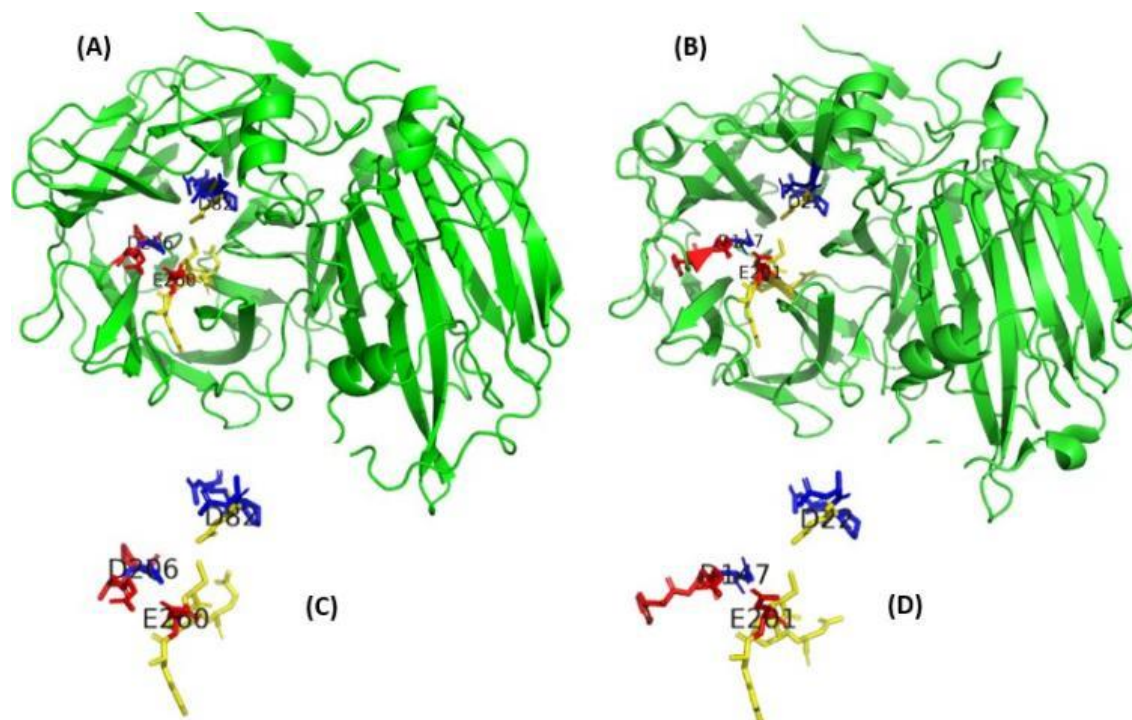


Figura 3.7. Sitio activo y residuos críticos de la FEH de *S. sonchifolius* (A,C), en comparación de los mismos en *C. intybus* 1ST8 (B,D).

La N-glucosilación es una modificación postraducciona importante de las proteínas en las células vegetales y es característica de las glucosil hidrolasas de la familia GH-32. Este proceso se inicia en el retículo endoplásmico mediante la transferencia de un oligosacárido precursor a residuos específicos de asparagina de la cadena polipeptídica naciente. Van den Ende *et al.* (2000) clonando la 1-FEH de achicoria obtenida a partir de ADNc afirmaron que esta proteína tendría no menos de diez glucosilaciones. En la Figura 3.4 se subrayan cinco sitios de glucosilación predictivos para la 1-FEH de yacón encontrados a través del software (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/>) 46 NATG, 175 NLSD, 242 NWTR, 270 NSTN y 573 NGTQ. (Gupta y Brunak, 2002).

Verhaest *et al.* (2005) identificaron dos sitios de N-glucosilación en la proteína 1ST8 de *C. intybus*, uno a nivel de N116 en el dominio hélice propulsor N-terminal y otro en N 513 en el dominio de lámina beta C-terminal. Ambos se sitúan en la superficie de la proteína, lejos del sitio activo y de la hendidura de unión al azúcar. Con esta información se realizó la búsqueda de los sitios de glucosilación posibles en la 1-FEH de yacón por homología con la proteína 1-FEH IIa (1ST8) utilizando el Protein Data Bank, con la opción 3D interactions https://www.rcsb.org/3d-view/1ST8/0?preset=oligoInteraction&label_asym_id=C. Estas glucosilaciones probables serían, el disacárido NAG-NAG relacionado a los residuos N175 y D178 del dominio hélice propulsor N-terminal y el trisacárido NAG-NAG-MAN relacionado a los residuos S459 y N573 del dominio de lámina beta C-terminal. (Figura 3.8) Le Roy *et al.* (2007b) trabajando con la estructura 1ST8 de *C. intybus* destacaron la presencia de varias moléculas de glicerol en la hendidura que emerge desde el sitio activo entre los dominios N-terminal y C-terminal de la 1-FEH IIa como un indicativo del sitio de unión del azúcar sustrato. Además, advirtieron la ausencia de un sitio putativo de N-glucosilación (N-X-

S/T) cerca de la hendidura como una característica general de todas las 1-FEH capaces de degradar fructanos de tipo inulina, pues las enzimas vegetales que no hidrolizan inulinas contienen un sitio de glicosilación putativo, que muy probablemente bloquea la hendidura. Se han identificado también tres sitios (N-X-S/T) putativos de N-glucosilación en la 1-FEH de *Arctium lappa* : NLS, NST y NGT (Ueno *et al.*, 2011). Se puede asumir que una configuración de hendidura abierta es necesaria para una unión óptima de la inulina y que la presencia o ausencia de una cadena glucosídica entre los dos dominios de la 1-FEH es importante para la estabilidad y la conformación óptima de la enzima. (Le Roy *et al.*, 2007b).

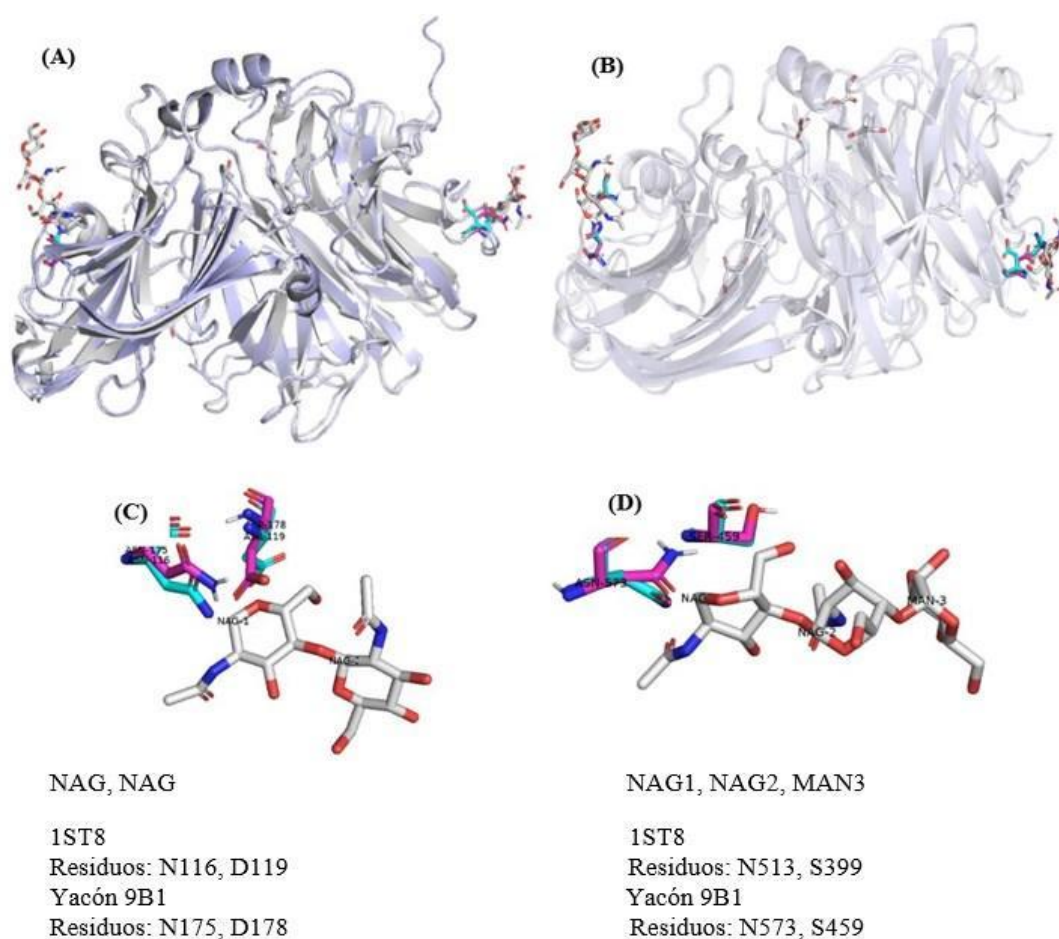


Figura 3.8 Estructuras de la 1-FEH IIa de *C. intybus* (A) y la 1-FEH putativa de yacón (B) con los sitios probables de N-glucosilación entre los dos dominios de la proteína.

Alineamiento de aminoácidos que se glucosilan con NAG-NAG (C) y con NAG-NAG-MAN3(D) respectivamente, en las dos proteínas.

6. CONCLUSIONES

- ⊖ La optimización del protocolo de CTAB permitió obtener una preparación de ARN total con el que se obtuvo gran parte del ADNc que codifica para la FEH de yacón.
- El clonamiento de los amplicones parciales obtenidos mediante RT-PCR y RACE '3, permitieron ensamblar una secuencia codificante de nucleótidos correspondiente a 516 aminoácidos de la proteína y 292 nucleótidos en la región no codificante 3'. El posterior análisis *in-silico*, permitió completar el marco abierto de lectura (ORF), que identifica una proteína de 603 aminoácidos.
- La secuencia de aminoácidos deducida del ADNc que codifica para la 1-FEH de yacón mostró un alto grado de identidad con las 1-FEH IIa de asteráceas como *H. tuberosus*, *H. annuus*, *C. intybus*, *V. herbácea* y *A. lappa*
- El modelamiento de la estructura de la 1-FEH de yacón mostró la presencia de tres motivos claves de la llamada triada catalítica, necesarios para la actividad exo hidrolasa de la enzima,
- La predicción de la estructura de la 1-FEH de yacón mostró semejanza con la estructura cristalizada de la proteína 1ST8 (1-FEH IIa de *C. intybus*) observándose similitud en la disposición de los residuos críticos (triada catalítica) necesarios para el correcto funcionamiento de la enzima.

CONCLUSIONES GENERALES

- 1. Las accesiones de yacón** ACW 5076, SAL 136, DPA 07011, AMM 5163 y AME 5186 presentaron alta variabilidad en el contenido de materia seca, sólidos solubles, azúcares y fructooligosacáridos (FOS) durante el tiempo de cultivo, con una máxima acumulación de FOS alrededor de los 7 meses. Las accesiones mostraron diferencias en la estabilidad de FOS y en la actividad enzimática relacionada, así como en la respuesta al ambiente.
- 2. La enzima fructano exohidrolasa (FEH) de yacón (AMM5163)** mostró una actividad óptima a pH 5.5 y temperatura de 30 °C. El proceso de purificación incluyó el uso de la precipitación fraccionada con sulfato de amonio, ultrafiltración y el uso de cromatografías de afinidad y de intercambio aniónico. Se logró una purificación de la FEH mayor a 100 veces confirmando además su especificidad por sustratos de cadena corta, como la kestosa.
- 3. La secuencia de aminoácidos deducida del ADNc que codifica para la 1-FEH de yacón** identificó una proteína de 603 aminoácidos con un alto grado de identidad con otras FEH de asteráceas, lo que sugiere una relación evolutiva cercana entre estas especies. El modelamiento de la estructura predicha de la FEH de yacón mostró similitud en la disposición de los residuos necesarios para el correcto funcionamiento de la enzima con la 1-FEH IIa cristalizada de *C. intybus* (1ST8).

RECOMENDACIONES GENERALES

1. Estudiar la variación estacional de las enzimas del metabolismo de los fructanos en una accesión prominente del yacón utilizando mínimamente dos pisos altitudinales y dos estaciones de cultivo bajo un mismo manejo agronómico. Es recomendable además considerar evaluar diferentes parámetros fisiológicos en las plantas desde el inicio del crecimiento de la parte aérea y el movimiento de azúcares tanto en los rizóforos que se usen como semilla como en la raíces tuberosas jóvenes y maduras.
2. La ultrafiltración para concentrar el extracto enzimático en el proceso de purificación resulta muy eficiente. Sin embargo, es recomendable conservar una parte del permeado que no es retenido en la membrana para analizar e identificar posibles inhibidores presentes en el extracto.
3. Para realizar la purificación de la fructano exohidrolasa en raíces de yacón debe considerarse la existencia de isoformas. La cromatografía de afinidad es muy recomendable dada la naturaleza glicoproteica de la enzima. El uso combinado de intercambiadores aniónicos y catiónicos en diferentes niveles de pH puede ser de ayuda para su adecuada separación.
4. Se recomienda validar la secuencia inferida de la FEH de yacón a través de su expresión heteróloga en *E.coli* o *Pichia pastoris* y comprobar su funcionalidad en sustratos específicos.
5. Continuar la investigación sobre la FEH de yacón en la búsqueda de isoformas, sus mecanismos de regulación y actividad enzimática utilizando accesiones de yacón seleccionadas y herramientas moleculares actualizadas.
6. Promover una cultura de producción del yacón dirigida a obtener un recurso con las propiedades funcionales óptimas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

INTRODUCCIÓN

Arnao I, Seminario J, Cisneros R, Trabucco J. Potencial antioxidante de 10 accesiones de yacón, *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson, procedentes de Cajamarca – Perú. Anales de la Facultad de Medicina. 2011;72(4): 239-243.

Caballero L, Colonia AM. Yacón como planta promisoría en el manejo de enfermedades. Investigaciones andinas. 2018; 20(36): 145-157

Choque GT, da Silva WM, Maróstica MR, Pastore GM. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*): A functional food. Plant Foods for Human Nutrition. 2013; 68(3):222-228.

De Ford C, Ulloa JL, Catalán CAN, Grau A, Martino VS, Muschietti LV, Merfort I. The sesquiterpene lactone polymatin B from *Smallanthus sonchifolius* induces different cell death mechanisms in three cancer cell lines. Phytochemistry. 2015; 117:332-339.

Fernández EC, Rajchl A, Lachman J, Cízková H, Kvasnicka F, Kotíková Z, Milella L, Voldrich M. Impact of yacon landraces cultivated in the Czech Republic and their ploidy on the short- and long-chain fructooligosaccharides content in tuberous root. LWT – Food Science and Technology. 2013; 54:80-86.

Fukai K, Miyazaki S, Nanjo F, Hara Y. Distribution of Carbohydrates and Related Enzyme Activities in Yacon (*Polymnia sonchifolia*). Soil Sci. Plant Nutr. 1993; 39(3): 567-571.

Fukai K, Ohno S, Goto K, Nanjo F, Hara Y. Seasonal Fluctuations in fructano content and related enzyme activities in Yacon (*Polymnia sonchifolia*). Soil Science and Plant Nutrition. 1997; 39(3):567-571.

Gomes MF, Dionísio AP, Ferreira AA, Silveira L, Oliveira C, Pinto FA, et al. Yacon syrup: Food applications and impact on satiety in healthy volunteers. *Food Research International*. 2017; 100(1): 460-467.

Gusso AP, Mattanna P, Richards N. Yacon: benefícios à saúde e aplicações tecnológicas. *Ciência Rural*. 2015; 45(5): 912-919.

Hermann M, Freire I, Pazos C. Compositional Diversity of the Yacon Storage Root. CIP Program Report 1997-98. 1999. p. 425-432.

Mansilla RC, López C, Blas R, Chia J, Baudoin J. Análisis de la variabilidad molecular de una colección peruana de *Smallanthus sonchifolius* (Poepp & Endl) H. Robinson “Yacon”. *Ecología aplicada*. 2006; 5(1,2):75-80.

Ohya T, Ito O, Yasuyoshi S, Ikarashi T, Minamisawa K. Kubota M. et al. Composition os Storage Carbohydrate in Tubers of Yacon (*Polymnia sonchifolia*). *Soil. Sci. Plant Nutr*. 1990; 36(1): 167-171.

Pereira MF, Soares IdC, Cabral MM, de Freitas PA, Sousa GMA, Magalhães SC, et al. Impacts of Yacon Syrup (*Smallanthus sonchifolius*) on Human Health: A Systematic Review of Scientific Evidence from the Last Decade. *Nutrients* 2025; 17: 888.

Rodríguez SY, Seminario A, Vásquez V, Seminario JF. Rendimiento agronómico de ocho cultivares de yacón (*Smallanthus sonchifolius* [Poepp & Endl.] H. Rob.) provenientes del norte peruano. *Siembra*. 2022; 9(1): e3630.

Santa Cruz-Padilla AE, Vásquez-Orrillo JL, Rodríguez SY, Eugenio A, Bardales-Lozano RM, Seminario JF, Murga-Orrillo H. Phenotypic variability of *Smallanthus sonchifolius* germplasm of Peru. *Genetic Resources*. 2025; 6(12): 26–38.

Soto JV. Evaluación de la diversidad genética de colecciones de *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl) “Yacón” del Perú. Tesis para optar el grado de Magister Scientiae en Mejoramiento Genético de Plantas. Universidad Nacional Agraria la Molina. 2012. 71p.

Valdez G, Margalef MI, Gómez M. Contenido de fructanos en raíces de yacón (*Smallanthus sonchifolius*) almacenadas en diferentes condiciones. Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud. 2019; 2(3): 11-17.

Vílchez H, Pineda M, Villanueva L. Actividad hipoglucemiante de los extractos de *Smallanthus sonchifolius* “yacón” y *Vitis vinífera* “uva” en ratas con diabetes inducida por aloxano. Arnaldoa. 2018; 25(2):539-564.

Yan MR, Welch R, Rush EC, Xiang X, Wang X. A sustainable wholesome foodstuff; health effects and potential dietotherapy application of yacon. Nutrients. 2019; 11(11): 2632.

CAPITULO 1

Amaya J. Desenvolvimento de yacón (*Polymnia sonchifolia* Poep. & Endl.) a partir de rizóforos e de gemas axilares, em diferentes espaçamentos. Tese do título de Doutor em Agronomia – Area de Concentração em horticultura Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Brasil. 2002. 89 p.

AOAC. Official Methods of Analysis (16th ed.). Association of Official Analytical Chemists. Washington DC, USA. 1995.

Apolinario AC, Damasceno BPGL, Beltrao NEM, Pessoa A, Converti A, Silva JA. Inulin-type fructans; A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. Carbohydrate Polymers. 2014; 101: 368-378.

Arango O, Cuarán GP, Fajardo JC. Extracción, cristalización y caracterización de inulina a partir de yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp.& Endl.) para su utilización en la industria alimentaria y farmacéutica. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 2008; 6 (2): 14-20.

Asami T, Minamisawa K, Tsuchiya T, Kano K, Hori I, Ohyama T, et al. Fluctuation of oligofructan contents in tubero of yacon (*Polymnia sonchifolia*) during growth and storage. Soil Science and Plant Nutrition. 1991; 62(6):621-627.

Asega AF, Carvalho MAM. Fructan metabolizing enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* upon excision of aerial organs. Plant Physiology and Biochemistry. 2004; 42:313-319.

Asega AF, Nascimento JRO, De Carvalho MAM. Increased expression of fructan 1-exohydrolase in rhizophores of *Vernonia herbacea* during sprouting and exposure to low temperature. Journal of Plant Physiology 2011; 168:558-565.

Bradford M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72: 248-254.

Brako L, Zarucchi J. Catalogue of the flowering plants and gymnosperms in Peru. Missouri Botanical Garden. 1993. 45p.

Caballero L, Colonia AM. Yacón como planta promisorio en el manejo de enfermedades. *Investigaciones Andina*. 2018; 20(36): 145-157.

Cabrera RM, Sánchez KJ, Linares A. Manual de manejo agronómico del yacón (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson). Instituto Nacional de Innovación Agraria. 2019; 18 p. ISBN: 978-9972-44-043-4.

Caetano BFR, De Moura NA, Almeida APS, Dias MC, Sivieri K, Barbisan LF. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as a food supplement: Health-Promoting Benefits of Fructooligosaccharides. *Nutrients*. 2016; 8(7): 436.

Chirinos R. Obtención y caracterización de los oligofructanos a partir de la raíz del yacón (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) Tesis para optar el grado de *Magister Scientiae*. Especialidad en Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima . Peru. 1999. 157 p.

Chirinos R, Mendoza R, Aguilar-Gálvez A, Campos D. Hidrólisis química y enzimática de extracto de yacón (*Smallanthus sonchifolius*) para la producción de fructosa. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 2017; 83(2): 200-212.

De Almeida Paula HA, Abranches MV, De Lucas Fortes Ferreira CL. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*): A Food with Multiple Functions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2015; 55(1): 32–40.

Degasperi M, Itaya N, Buckeridge M, Figueiredo-Ribeiro R. Fructan degradation and hydrolytic activity in tuberous roots of *Vigneira discolor* Baker (Asteraceae), a herbaceous species from the cerrado. *Revista Brasil. Bot.* 2003; 26 (1) 11-21.

De Roover J, Van Laere A, De Winter M, Timmermans J, a W. Purification and properties of a second fructan exohydrolase from the roots of *Cichorium intybus*. *Physiology Plantarum.* 1999; 106: 28-34.

Dostert N, Roque J, Cano A, La Torre MI, Weigend M. Hojas botánicas: Yacón – *Smallanthus sonchifolius* (Poepp.) H. Rob. Proyecto PeruBiodiverso – PBD, 1º Edición. 2009.

Edelman J, Jefford TG. The mechanism of fructan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New Phytol.* 1968; 67: 517-531

Eddouks M, Bidi A, Bouhali BE, Hajji L, Zeggwagh NA. Antidiabetic plants improving insulin sensitivity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2014; 66:1197-1214.

Fonseca Contado EWNd, de Rezende Queiroz E, Rocha DA, Fraguas RM, Simao AA, Botelho LNS, et al. Extraction, quantification and degree of polymerization of yacon (*Smallanthus sonchifolia*) fructans. *African Journal of Biotechnology.* 2015; 14(21), 1783-1789.

Fukai K, Ohno S, Goto K, Nanjo F, Hara Y. Seasonal Fluctuations in fructano content and related enzyme activities in Yacon (*Polymnia sonchifolia*). *Soil Science and Plant Nutrition.* 1997; 39(3):567-571.

Genta S, Cabrera W, Habib N, Pons J, Manrique I, Grau A. Sanchez S. Yacon syrup: Beneficial effects on obesity and insulin resistance in humans. *Clinical Nutrition*. 2009; 28: 182-187.

Graefe S, Hermann M, Manrique I, Golombek S, Buerkert A. Effects of post-harvest treatments on the carbohydrate composition of yacon roots in the Peruvian Andes. *Field Crops Research*. 2004; 86: 157-165.

Grancieri M, Costa NMB, Tostes MG, Oliveira DS, Nunes LC, Marcon LN. Yacon flour (*Smallanthus sonchifolius*) attenuates intestinal morbidity in rats with colon câncer. *Journal of Functional Foods*. 2017; 37: 666–675

Grau A, Rea J. Yacon. *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson. En: Hermann, M., Heller, J. (eds): Andean roots and tubers: Ahipa, arracacha, maca and yacon. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research. 1997. p.199-242.

Gusso AP, Mattanna P, Richards N. Yacon: benefícios à saúde e aplicações tecnológicas. *Ciência Rural*. 2015; 45(5): 912-919.

Hermann M, Freire I, Pazos C. Compositional Diversity of the Yacon Storage Root. CIP Program Report 1997-98. 1999. p. 425-432.

Hoebregs H. Fructans in Foods and Food Products, Ion-Exchange Chromatographic Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*. 1997; 80: 1029-1037.

Itaya N, Machado de Carvalho M, Figueredo-Ribeiro R. Fructosyl transferase and hydrolase activities in rhizophores and tuberous roots upon growth of *Polymnia sonchifolia* (Asteraceae). *Physiologia Plantarum*. 2002; 116:451-459.

Jaime L, Martin-Cabrejas MA, Mollá E, López-André F, Esteban RM. Effects of storage on fructan and fructooligosaccharide on onion (*Allium cepa* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2001; 49(2): 982-988.

Khajehei F, Merkt N, Claupein W, Graeff-Hoenninger S. Yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl.) as a Novel Source of Health Promoting Compounds:Antioxidant Activity, Phytochemicals and Sugar Content in Flesh, Peel, and Whole Tubers of Seven Cultivars. Molecules. 2018; 23: 278.

Khaldari I, Naghavi MR, Peighambari SA, Nasiri J, Mohammadi F. Expression patterns of the genes encoding fructan active enzymes (FAZYs) alongside fructan constituent profiles in chicory (*Cichorium intybus* L.): effects of tissue and genotype variations. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology. 2018.

Kamp L, Hartung J, Mast B, Graeff-Hönninger S. Impact of nitrogen fertilization on tuber yield, sugar composition and nitrogen uptake of two yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl.) genotypes. Agronomy. 2019; 9 (151).

Kortsarz AM, Zannier ML, Grau A. Variación estacional de azúcares de reserva de yacón cultivado en el pedemonte de Tucumán. Revista Industrial y Agrícola de Tucumán. 2015; 92(2): 17-22.

Lachman J, Fernández EC, Orsák M. Yacon [*Smallanthus sonchifolia* (Poepp. et Endl. H. Robinson)] chemical composition and use – review. Plant Soil Environ. 2003; 49(6): 283 – 290.

Lobo A, Colli C, Alvares E, Filisetti T. Effects of fructan-containing yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl.)flour on caecum mucosal morphometry, calcium and magnesium balance, and bone calcium retention in growing rats. British Journal of Nutrition 2007; 97:776-785.

Manrique I, Párraga A, Hermann M. Jarabe de yacón: Principios y procesamiento. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003). No. 8^a. Centro Internacional de la Papa, Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión, Fundación Erbacher, Agencia Suiza para el desarrollo y la Cooperación. Lima, Perú. 2005. 31 p.

Manrique J, Hermann M, Bernet T. Yacón: Ficha técnica. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú. 2004.

Marquez-Lopez RE, Uc-Chuc MA, Loyola-Vargas VM, Santiago-García PA, Lopez MG. Fructosyltransferases in plants: Structure, function and application: A review. Carbohydrate Polymer Technologies and Applications. 2023; 6:100343.

Martins MLR, Delmaschio KL, Cordeiro AA. Efeitos da utilização de *Smallanthus sonchifolius* (yacon) no tratamento de indivíduos com Diabetes mellitus. Ceres 2011; 6(1):35-43.

Marx S, Nosberger J, Frehner M. Seasonal variation of fructan- β -(2-1)-linkage specific FEH from tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). New Phytol. 1997; 135: 267-277.

Mascoco JL, Jorge-Montalvo P, Mansilla-Samaniego R, Haro-Reyes JA, Flores del Pino L, Tellez L. Determination of fructooligosaccharides and inulin in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) products from two Peruvian regions exhibiting genetic similarity. Journal of Food Composition and Analysis. 2025; 148: 108231.

Mercado MI, Araoz MVC, Manrique I, Grau A, Catalan CAN. Variability in sesquiterpene lactones from the leaves of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) accessions of different geographic origin. Genet. Resour.Crop Evol. 2014; 61:1209-1217.

Mercado MI, Ponessa GI, Grau A. Morfología y Anatomía Foliar de “Yacón”, *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae), con fines de control de calidad. Acta Farm. Bonaerense. 2006; 25(4): 526-532.

Michiels A, Van Laere A, Van Den Ende W, Tucker M. Expression analysis of a chicory fructan 1-exohydrolase gene reveals complex regulation by cold. Journal of Experimental Botany 2004; 55(401):1325-1333.

Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego [MIDAGRI]. s.f. Información estadística Agraria: Perfil Productivo y Regional. Yacón [en línea]. Consultado el 15 de Setiembre del 2024 en: https://siea.midagri.gob.pe/siea_bi/

Muñoz AM, Blanco T, Serván K, Alvarado-Ortiz C. Evaluación del contenido nutricional del yacón (*Polymnia sonchifolia*) procedente de sus principales zonas de producción nacional. Horizonte Médico. 2006; 6(2): 69-73.

Myint PP, Dao TTP, Kim YS. Anticancer Activity of *Smallanthus sonchifolius* Methanol Extract against Human Hepatocellular Carcinoma Cells. Molecules. 2019; 24:3054.

Ojansivu I, Ferreira CL, Salminen S. Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. Trends in Food Science & Techonology. 2011; 22(1); 40-46.

Pan LH, Yao ZW, Hu WF, Jia HT, Ren WL, Wang PP, et al. Yacon root is a fincional food beneficial for human health: a meta-analysis of clinical trials. Frontiers in Nutrition.2025; 12:1739768.

Pedreschi R, Campos D, Noratto G, Chirinos R, Cisneros-Zevallos L. Andean yacon root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & End) fructooligosaccharides as a potential novel source of prebiotics. J. Agric. Food Chem. 2003; 51: 5278-5284.

Pereira MF, Soares IdC, Cabral MM, de Freitas PA, Sousa GMA, Magalhães SC, et al. Impacts of Yacon Syrup (*Smallanthus sonchifolius*) on Human Health: A Systematic Review of Scientific Evidence from the Last Decade. *Nutrients* 2025; 17: 888.

Portes MT, Figueredo-Ribeiro RC, Carvalho MAM. Low temperature and defoliation affect fructan-metabolizing enzymes in different regions of the rhizophores of *Vernonia herbacea*. *Journal of Plant Physiology* 2008; 165:1572-1581.

Ritsema T, Smeekens S. Engineering fructan metabolism in plants. *Journal of Plant Physiology* 2003; 160: 811-820.

Rodríguez SY, Seminario A, Vásquez V, Seminario JF. Rendimiento agronómico de ocho cultivares de yacón (*Smallanthus sonchifolius* [Poepp & Endl.] H. Rob.) provenientes del norte peruano. *Siembra*. 2022; 9(1): e3630.

Santa Cruz-Padilla AE, Vásquez-Orrillo JL, Rodríguez SY, Eugenio A, Bardales-Lozano RM, Seminario JF, Murga-Orrillo H. Phenotypic variability of *Smallanthus sonchifolius* germplasm of Peru. *Genetic Resources*. 2025; 6(12): 26–38.

Sarmiento-Rubiano LA, Luna M, Pertúz K, Becerra JE, Rebolledo R, Suarez M. Desarrollo de um endulzante natural a base de yacón (*Smallanthus sonchifolius*) y su evaluación sensorial. *Revista Española de Nutrición Comunitaria*. 2023; 29:3.

Seminario J, Valderrama M, Manrique I. El yacón: fundamentos para el aprovechamiento de un recurso promisorio. Centro Internacional de la papa (CIP), Universidad Nacional de Cajamarca, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación (COSUDE). 2003. 60p.

Silva DMN, Lima RR, Oliveira FL, Teixeira LJQ, Machado LCA. Physical and chemical characterization of yacon tuberos roots produced at different altitudes and planting times. *Horticultura Brasileira*. 2018; 36: 199-204.

Silva IFd, Bragante WR, Junior RCM, Laurindo LF, Guiguer EL, Araújo AC, *et al.* Effects of *Smallanthus sonchifolius* Flour on Metabolic Parameters:A Systematic Review. *Pharmaceuticals* 2024; 17: 658.

Tochio T, Kadota Y, Tanaka T, Koga Y. 1-Kestose, the smallest fructooligosaccharide component, which efficiently stimulates *Faecalibacterium prausnitzii* as well as bifidobacteria in humans. *Foods*. 2018; 7: 140.

Trevisan F, Oliveira VF, Carvalho MAM, Gaspar M. Effects of different carbohydrate sources on fructan metabolism in plants of *Chrysolaena obovata* grown *in vitro*.*Front. Plant Sci.*2015; 6:681.

Valentová K, Stejskal D, Bartek J, Dvorácková S, Kren V, Ulrichová J, *et al.* Maca (*Lepidium meyenii*) and yacon (*Smallanthus sonchifolius*) in combination with sylimarin as food supplements: *In vivo* safety assessment. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 1006-1013.

Valderrama M. Manual del cultivo de yacón. Experiencias de introducción y manejo técnico en el Valle de Condebamba. Cajamarca-Perú: PYMAGROS. 2005.

Van den Ende W, Mintiens A, Speleers H, Onuoha AA, Van Laere A. The metabolism of fructans in roots of *Cichorium intybus* during growth, storage and forcing. *New Phytol.*1996; 132:555-563.

Van den Ende W, De Roover J, Van Laere A. Effect of nitrogen concentration on fructan and fructan metabolizing enzymes in young chicory plants (*Cichorium intybus*). *Physiologia Plantarum* 1999; 105(1): 2–8.

Van den Ende W, Michiels A, Van Wouterghem D, Clerens S, De Roover J, Van Laere A. Defoliation induces fructan 1-exohydrolase II in Witloof chicory roots. Cloning and purification of two isoforms, fructan 1-exohydrolase IIa y fructan1-exohydrolase IIb. Mass fingerprint of the fructan 1-exohydrolase II enzymes. *Plant Physiology* 2001; 126: 1186-1195.

Van den Ende W, Michiels A, De Roover J, Van Laere A. Fructan Biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases. Expression of fructan genes throughout chicory development. *The Scientific World Journal* 2002; 2:1281-1295.

Van den Ende W. Multifunctional fructans and raffinose family oligosaccharides. *Frontiers in Plant Science* 2013; 4:247.

Van Laere A, Van Den Ende W. Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system. *Plant, Cell and Environment* 2002; 25:803-813.

Vijn I, Smeekens S. Fructan: More than a reserve carbohydrate? *Plant Physiology* 1999; 120: 351-359.

Vilhena SMC, Câmara FLA, Piza IMT, Lima GPP. Contenido de fructanos em raízes tuberosas de yacón (*Polymnia sonchifolia*). *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 2003; 4(1): 35-40.

Yuanita L, Sabtiawan WB, Wikandari PR, Sari DAP. Fruktooligosaccharides of Yacon tubers (*Smallanthus sonchifolia*) on variation in height of planting area, harvest time and

storage with natural inhibitors. In: International Joint Conference on Science and Engineering (IJCSE 2020). 2020. p. 277-281.

Zhu ZY, Zhang JY, Chen LJ, Liu XC, Liu Y, Wang WX, Zhang YM. Comparative evaluation of polysaccharides isolated from *Astragalus*, oyster mushroom, and yacon as inhibitors of α - glucosidase. Chinese Journal of Natural Medicines 2014; 12(4):0290-0293.

CAPITULO 2

Asega AF, Carvalho MAM. Fructan metabolizing enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* upon excision of aerial organs. *Plant Physiology and Biochemistry* 2004; 42:313-319.

Asega AF, Nascimento JRO, Schroeven L, Van Den Ende W, De Carvalho MAM. Cloning, characterization and functional analysis of a 1-FEH cDNA from *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. *Plant Cell Physiology* 2008; 49(8):1185-1195.

Asega AF, Nascimento JRO, De Carvalho MAM. Increased expression of fructan 1-exohydrolase in rhizophores of *Vernonia herbacea* during sprouting and exposure to low temperature. *Journal of Plant Physiology* 2011; 168 :558–565.

Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72: 248-254.

Bonnett GD, Simpson RJ. Fructan-hydrolyzing activities from *Lolium rigidum* Gaudin. *New Phytologist*. 1993; 123(3):443–451.

Bonnett GD, Sims IM, St. John JA, Simpson RJ. Purification and characterization of fructans with β -2,1 and β -2,6-glycosidic linkages suitable for enzyme studies. *New Phytologist*. 1994; 127:261-269.

Bonnett GD, Simpson RJ. Fructan exohydrolase activities from *Lolium rigidum* that hydrolyse β -2,1- and β -2,6-glycosidic linkages at different rates. *New Phytologist* 1995; 131:199–209.

Claessens G, Van Laere A, De Proft M. Purification and Properties of an Inulinase from Chicory roots (*Chicorium intybus* L.) *Journal of Plant Physiology*. 1990; 136: 35-39.

- Contado EWF, de Rezende Queiroz E, Rocha DA, Fraguas RM, Simao AA, Botelho LNS, et al.** Extraction, quantification and degree of polymerization of yacon (*Smallanthus sonchifolia*) fructans. African Journal of Biotechnology. 2015; 14(21):1783-1789.
- Davey M, Huang J, Sulkowski E, Carter W.** Hydrophobic Interaction of Human Interferon with Concanavalin A-Agarose. The Journal of Biological Chemistry. 1974; 249(19): 6354-6355.
- Degasperi M, Itaya N, Buckeridge M, Figueiredo-Ribeiro R.** Fructan degradation and hydrolytic activity in tuberous roots of *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae), a herbaceous species from the cerrado. Revista Brasi. Bot. 2003; 26 (1):11-21.
- De Roover J, Van Laere A, De Winter M, Timmermans J, Van Den Ende W.** Purification and Properties of a second fructan exohydrolase from the roots of *Chicorium intybus*. Physiologia Plantarum 1999a;106: 28-34.
- De Roover J, Van Laere A, Van den Ende W.** Effect of defoliation on fructan pattern and fructan metabolizing enzymes in young chicory plants (*Cichorium intybus*) Physiologia Plantarum 1999b;106: 158-163.
- Edelman J, Jefford TG.** The Metabolism of Fructose Polymers in Plants. Biochem.J. 1964; 93:148-161.
- Edelman J, Jefford TG.** The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. New Phytologist. 1968; 67:517-531.
- Fan W, Wang S, Wang H, Wang A, Jiang F, Liu H, et al.** The genomes of chicory, endive, great burdock and yacon provide insights into Asteraceae paleo-polyploidization history and plant inulin production. Molecular Ecology Resources, 2022; 00:1–17.

Fukai K, Ohno S, Goto K, Nanjo F, Hara Y. Seasonal Fluctuations in fructano content and related enzyme activities in Yacon (*Polymnia sonchifolia*). Soil Science and Plant Nutrition. 1997; 39(3):567-571.

Gasperl A, Morvan-Bertrand A, Prud'homme MP, van der Graaff E, Roitsch T. A Simple and Fast Kinetic Assay for the Determination of Fructan Exohydrolase Activity in Perennial Ryegrass (*Lolium perenne* L.). Frontiers in Plant Science. 2015; 6(DEC): 1–9.

Gonzalez-Diaz RL, Rodríguez-Gómez F, Cortés-Romero C. Exohidrolasas fructosílicas y su importancia en el metabolismo de fructanos en *Agave tequilana* Weber var. *azul*. Revista Colombiana de Química. 2020; 49(3):3-12.

Henson CA, Livingston III DP. Purification and characterization of an Oat Fructan Exohydrolase that preferentially hydrolyzes α -2,6-fructans. Plant Physiology. 1996; 110: 639-644

Henson CA, Livingston III DP. Characterization of a fructan exohydrolase purified from barley stems that hydrolyzes multiple fructofuranosidic linkages. Plant Physiology and Biochemistry. 1998; 36: 715-720.

Itaya N, Machado de Carvalho M, Figueiredo-Ribeiro R. Fructosyl transferase and hydrolase activities in rhizophores and tuberous roots upon growth of *Polymnia sonchifolia* (Asteraceae). Physiologia Plantarum. 2002; 116: 451-459.

Itaya NM, Asega AF, Carvalho MA, Figueiredo-Ribeiro Rde C. Hydrolase and fructosyltransferase activities implicated in the accumulation of different chain size fructans in three Asteraceae species. Plant Physiol Biochem. 2007; 45(9):647-56.

Koops A, Jonker H. Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* Colombia. Plant Physiology 1996; 110:1167-1175

Lammens W, Le Roy K, Schroeven L, Van Laere A, Rabijns A, Van den Ende W. Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications. Journal of Experimental Botany. 2009; 60(3):727–740.

Livingston D, Henson C. Apoplastic Sugars, Fructans, Fructan Exohydrolase, and Invertase in Winter Oat: Responses to second-phase cold hardening. Plant Physiology. 1998; 116: 403-408.

Livingston DP, Hinch DK, Heyer AG. Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants. Cellular and Molecular Life Sciences. 2009; 66(13): 2007–2023.

Lothier J, Lasseur B, Le Roy K, Van Laere A, Prud'homme MP, Barre P, et al. Cloning, gene mapping, and functional analysis of a fructan 1-exohydrolase (1-FEH) from *Lolium perenne* implicated in fructan synthesis rather than in fructan mobilization. Journal of Experimental Botany. 2007; 58(8), 1969–1983.

Lothier J, Van Laere A, Prud'homme MP, Van den Ende W, Morvan-Bertrand A. Cloning and characterization of a novel fructan 6-exohydrolase strongly inhibited by sucrose in *Lolium perenne*. Planta. 2014; 240(3), 629–643.

Marx S, Nösberger J, Frehner M. Seasonal variation of fructan- β -fructosidase (FEH) activity and characterization of a β -(2-1)-linkage specific FEH from tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). New Phytologist. 1997a; 135: 267-277.

Marx S, Nösberger J, Frehner M. Hydrolysis of fructan in grasses: a β -(2–6)-linkage specific fructan- β -fructosidase from stubble of *Lolium perenne*. New Phytologist 1997b; 135:279–290

Meguro-Maoka A, Yoshida M. Analysis of seasonal expression levels of wheat fructan exohydrolase (FEH) genes regulating fructan metabolism involved in wintering ability. Journal of Plant Physiology. 2016; 191, 54–62.

Morvan A, Challe G, Prud'homme MP, Le Saos J, Boucaud J. Rise of fructan exohydrolase activity in stubble of *Lolium perenne* after defoliation is decreased by uniconazole, an inhibitor of the biosynthesis of gibberellins. New Phytol. 1997; 136: 81-88.

Narai-Kanayama A, Tokita N, Aso K. Dependence of fructooligosaccharide content on activity of fructooligosaccharide-metabolizing enzymes in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) tuberous roots during storage. Journal of Food Science 2007; 72 (6):381-387.

Nelson N. A Photometric Adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 1944; 153:375-380.

Obenland D, Simmen U, Boller T. Wiemken A. Purification and characterization of three soluble invertases from Barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. Plant Physiology 1993; 101:1331-1339.

Pavis N, Chatterton NJ, Harrison PA, Baumgartner S, Praznik W, Boucaud J, et al. Structure of fructans in roots and leaf tissues of *Lolium perenne*. The New Phytologist. 2001; 150(1): 83-95.

Ritsema T, Smeekens S. Fructans: beneficial for plants and humans. Curr. Opin. Plant Biol. 2003; 6(3): 223–230.

Ribeiro M, Ferreira D, Siopa J, Rodríguez-Quijano M, Nunes FM. Natural variation in the content and degree of polymerization of fructans in wheat: potential for selection of genotypes with beneficial health composition. *J. Agric. Food. Chem.* 2022; 70: 10929-10939.

Rutherford PP, Deacon AC. β -Fructofuranosidases from Roots of Dandelion (*Taraxacum officinale* Weber) *Biochem.J.* 1972;126:569-573.

Scopes, R.K. Protein Purification: Principles and Practice. 3rd Ed. Springer Advanced Texts in Chemistry. U.S.A. 1993. 380p.

Shi Y, Si D, Zhang X, Chen D, Han Z. Plant fructans: Recent advances in metabolism, evolution aspects and applications of human health. *Current Research in Food Science.* 2023; 7:100595.

Simpson RJ, Bonnett GD. Fructan exohydrolase from grasses. *New Phytologist.* 1993; 123:453-469.

Simpson RJ, Walkers RP, Pollock CJ. Fructan exohydrolase activity in leaves of *Lolium temulentum* L. *New Phytologist.* 1991; 119: 499-507

Smouter H, Simpson RJ. Fructan metabolism in leaves of *Lolium rigidum* Gaudin. II. Fructosyltransferase, invertase, and fructan hydrolase activity. *New Phytologist.* 1991; 119: 517–526.

Ueno K, Yokoshima S, Sasajima Y, Ishiguro Y, Yoshida M, Shiomi N, et al. Two Fructan 1-Exohydrolase Isoforms Hydrolyze Fructans in Edible Burdock (*Arctium lappa* L.) during Storage at a Low Temperature . *Journal of Applied Glycoscience* 2015; 62: 65-72.

Ueno K, Sonoda T, Yoshida M, Shiomi N, Onodera S. Purification, characterization, and functional analysis of a novel 6G&1-FEH mainly hydrolyzing neo-kestose from asparagus. *J. Exp. Bot.* 2018; 69:4295–4308

Van den Ende W, Van Laere A. Purification and properties of an invertase with sucrose sucrose fructosyltransferase (SST) activity from the roots of *Cichorium intybus* L. *New Phytologist*. 1993; 123: 31-37.

Van den Ende W, Van Laere A. Fructan Synthesizing and Degrading Activities in Chicory Roots (*Cichorium intybus* L.) during Field-growth, Storage and Forcing. *J. Plant Physiol.* 1996; 149:43-50.

Van den Ende W, De Roover J, Van Laere A. Effect of nitrogen concentration on fructan and fructan metabolizing enzymes in young chicory plants (*Cichorium intybus*). *Physiologia Plantarum*. 1999; 105(1): 2–8.

Van den Ende W, Michiels A, De Roover J, Verhaert P, Van Laere A. Cloning and functional analysis of chicory root fructan 1-exohydrolase I (1-FEH I): a vacuolar enzyme derived from a cell-wall invertase ancestor? Mass fingerprint of the 1-FEH I enzyme. *The Plant Journal*. 2000; 24(4): 447-456.

Van den Ende W, Michiels A, Wouterghem D, Clerens SP, De Roover J, Van Laere A. Defoliation induces fructan 1-exohydrolase II in Witloof chicory roots. Cloning and purification of two isoforms, fructan 1-exohydrolase IIa y fructan1-exohydrolase IIb. Mass fingerprint of the fructan 1-exohydrolase II enzymes. *Plant Physiology*. 2001; 126:1186-1195.

Van den Ende W, Michiels A, De Roover J, Van Laere A. Fructan biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases. Expression of fructan genes throughout chicory development. *Scientific World Journal*. 2002; 2: 1281–1295.

Van den Ende W, Clerens S, Vergauwen R, Van Riet L, Van Laere A, Yoshida M, *et al.* Fructan 1-Exohydrolases. β -(2,1)-Trimmers during Graminan Biosynthesis in Stems of Wheat? Purification, Characterization, Mass Mapping, and Cloning of Two Fructan 1-Exohydrolase Isoforms. *Plant Physiology*. 2003; 131: 621–631.

Van den Ende W, Lammens W, Van Laere A, Schroeven L, Le Roy K. Donor and acceptor substrate selectivity among plant glycoside hydrolase family 32 enzymes. *FEBS Journal*. 2009;276: 5788–5798.

Van Loo J. How chicory fructans contribute to zootechnical performance and weel-being in livestock and companion animals. *J. Nutr*. 2007; 137: 2594S-2597S.

Van Riet L, Nagaraj V, Van den Ende W, Clerens S, Wiemken A, Van Laere A. Purification, cloning and functional characterization of a fructan 6-exohydrolase from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Experimental Botany*. 2006; 57 (1):213-223.

Wagner W, Wiemken A, Matile P. Regulation of fructan metabolism in leaves of barley (*Hordeum vulgare* L. cv Gerbel). *Plant Physiol*. 1986; 81(2):444-7.

Wagner W, Wiemken A. Properties and Subcellular Localization of Fructan Hydrolase in the Leaves of Barley (*Hordeum vulgare* L. cv Gerbel). *Journal of Plant Physiology*. 1986; 123(5), 429–439.

Wang C, Van den Ende W, Tillberg J. Fructan accumulation induced by nitrogen deficiency in barley leaves correlates with the level of sucrose: fructan 6-fructosyltransferase mRNA. *Planta*. 2000; 211:701-707.

Wei H, Bausewein A, Greiner S, Dauchot N, Harms K, Rausch T, . CiMYB17, a stress-induced chicory R2R3-MYB transcription factor, activates promoters of genes involved in fructan synthesis and degradation. *New Phytol*. 2017; 215:281–298.

Wu S, Greiner S, Ma C, Zhong J, Huang X, Rausch T, Zhao H. A Fructan Exohydrolase from Maize Degrades Both Inulin and Levan and Co-Exists with 1-Kestotriose in Maize. *Int. J.Mol. Sci.* 2021; 22,5149.

Xu H, Liang M, Xu L, Li H, Zhang X, Kang J, *et al.* Cloning and functional characterization of two abiotic stress-responsive Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) fructan 1-exohydrolases (1-FEHs). *Plant Mol. Biol.* 2015; 87:81–98.

Yamamoto S, Mino Y. Partial Purification and Properties of Phleinase Induced in Stem Base of Orchardgrass after Defoliation. *Plant Physiol.* 1985; 78: 591-595.

Yamamoto S, Mino Y. Effect of sugar level on phleinase induction in stem base of orchardgrass after defoliation. *Physiologia Plantarum.* 1987; 69(3):456–460.

Yamamoto S, Mino Y. Mechanism of Phleinase Induction in the Stem Base of Orchardgrass after Defoliation. *Journal of Plant Physiology.* 1989; 134(2):258–260.

Yoshida M. Fructan Structure and Metabolism in Overwintering Plants. *Plants.* 2021, 10(5): 933.

Zhang J, Xu Y, Chen W, Dell B, Vergauwen R, Biddulph B, *et al.* A wheat 1- FEH w3 variant underlies enzyme activity for stem WSC remobilization to grain under drought. *New Phytologist.* 2015; 205(1): 293–305.

Zhan W, Jin L, Jiao J, Zhang X, Zhang Y, Zhao H, Liang M. Expression and purification of plant fructan exohydrolases and their potential applications in fructose production. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2018; 108: 9–17.

CAPITULO 3

Abramson J, Adler J, Dunger J. *et al.* Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*. 2024; 630: 493–500.

Alberto F, Bignon C, Sulzenbacher G, Henrissat B, Czjzek M. The three-dimensional structure of invertase (b-fructosidase) from *Thermotoga maritima* reveals a bimodular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting glycosidases. *Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279: 18903–18910

Ali N, Rampazzo RD, Costa AD, Krieger MA. Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. *BioMed Research International*. 2017. ID 9306564. 13p.

Altenbach D, Nüesch E, Meyer A, Boller T, Wiemken A. The large subunit determines catalytic specificity of barley sucrose:fructan 6-fructosyltransferase and fescue sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase. *FEBS Letter*. 2004; 567:214-218.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW. Basic local alignment search tool. *Lipman DJ. J Mol Biol*. 1990; 215(3): 403-10.

Asega A, do Nascimento JR, Schroeven L, Van den EndeW, Carvalho MA. Cloning, characterization and Functional Analysis of a 1-FEH cDNA from *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. *Plant Cell Physiol*. 2008; 49(8): 1185–1195

Baker D, Sali A. Protein Structure Prediction and Structural Genomics. *Science*. 2001; 294: 93 - 96.

Batista FR, Hernández L, Fernández JR, Arrieta J, Menéndez C, Gómez R, *et al.* Substitution of Asp-309 by Asn in the Arg-Asp-Pro (RDP) motif of *Acetobacter*

diazotrophicus levansucrase affects sucrose hydrolysis, but not enzyme specificity. The Biochemical Journal. 1999; 337 (3):503–506.

Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. Nature Protocols. 2006; (1): 581–585.

Coninck BD, Roy KL, Francis IM, Clerens S, Vergauwen R, Halliday AM, *et al.* *Arabidopsis* AtcwINV3 and 6 are not invertases but are fructan exohydrolases (FEHs) with different substrate specificities. Plant Cell and Environment. 2005; 28: 432-443.

Darwen CW, John P. Localization of the Enzymes of Fructan Metabolism in Vacuoles Isolated by a Mechanical Method from Tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). Plant Physiology. 1989; 89 (2): 658-63.

Fan W, Wang S, Wang H, Wang A, Jiang F, Liu H, *et al.* The genomes of chicory, endive, great burdock and yacon provide insights into Asteraceae paleo-polyploidization history and plant inulin production. Molecular Ecology Resources, 2022; 00:1–17.

Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution. 1985; 39:783-791.

Fernández R, Trapero A, Domínguez J. Experimentación en agricultura. Sevilla Consejería de Agricultura y Pesca, Servicio de Publicaciones y Divulgación. 2010.

Gupta R, Brunak S. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. Pac Symp Biocomput. 2002;:310-22.

Hettwer U, Jaeckel FR, Boch J, Meyer M, Rudolph K, Ullrich MS. Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of levansucrase genes from the

plant pathogens *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and *P. syringae* pv. *phaseolicola*. Appl Environ Microbiol. 1998; 64:3180–3187.

Kawakami A, Yoshida M, Van den Ende W. Molecular cloning and functional analysis of a novel 6&1-FEH from wheat (*Triticum aestivum* L.) preferentially degrading small graminans like bifurcose. Gene. 2005; 358: 93-101.

Lammens W, Le Roy K, Van Laere A, Rabijns A, Van den Ende W. Crystal structures of *Arabidopsis thaliana* cell-wall invertase mutants in complex with sucrose. Journal of molecular biology. 2008; 377 (2): 378-85 .

Lammens W, Le Roy K, Schroeve L, Van Laere A, Rabijns A, Van Den Ende W. Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: Functional implications. Journal of Experimental Botany. 2009; 60: 727–740

Le Roy K, Lammens W, Verhaest M, De Coninck B, Rabijns A, Van Laere A, *et al.* Unraveling the difference between invertases and fructan exohydrolases: A single amino acid (Asp-239) substitution transforms *Arabidopsis* cell wall invertase1 into a fructan 1-exohydrolase. Plant Physiology. 2007a; 145: 616–625.

Le Roy K, Verhaest M, Rabijns A, Clerens S, Van Laere A, Van den Ende W. *N*-glycosylation affects substrate specificity in chicory 1-FEH IIa: evidence for the presence of an inulin binding cleft. The New Phytologist. 2007b 176(2):317-324.

Le Roy K, Vergauwen R, Cammaer V, Yoshida M, Kawakami A, Van Laere A, Van den Ende W. Fructan 1-exohydrolase is associated with flower opening in *Campanula rapunculoides*. Funct Plant Biol. 2007c; 34(11):972-983.

Le Roy K, Lammens W, Van Laere A, Van den Ende W. Influencing the binding configuration of sucrose in the active sites of chicory 1-FEH IIa and sugar beet 6-FEH. *New Phytologist*. 2008; 178: 572–580

Lodhi MA, Guang-Ning Y, Norman FW, Bruce IR. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species and *Ampelopsis*. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1994; 12:6-13.

Lothier J, Lasseur B, Le Roy K, Van Laere A, Prudhomme MP, Barre P, et al. Cloning, gene mapping, and functional analysis of a fructan 1-exohydrolase (1-FEH) from *Lolium perenne* implicated in fructan synthesis rather than in fructan mobilization. *Journal of Experimental Botany*. 2007; 58: 1969–1983

Martí-Renom MA, Stuart AC, Fiser A, Sánchez R, Melo F, Sali A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*. 2000; 29: 291–325.

Martinez-Fleites C, Ortiz-Lombardia M, Pons T, Tarbouriech N, Taylor EJ, Arrieta JG, et al. Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biochemical Journal*. 2005; 390: 19–27.

Marx S, Nosberger J, Frehner M. Seasonal variation of fructan- β -(2-1)-linkage specific FEH from tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). *New Phytol.* 1997; 135: 267-277.

Meng GY, Fütterer K. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nature Structural Biology*. 2003; 10: 935–941.

Moreno Díaz P, Uchima Flores M, Cabrera Pintado R, Torres Aliaga R. Obtención de un ADN complementario que codifica una fructano 1-exohidrolasa en yacón,

Smallanthus sonchifolius (Poepp. &Endl.) H. Robinson. Scientia Agropecuaria. 2019; 10(2): 283-291.

Nagem RAP, Rojas AL, Golubev AM, Korneeva OS, Eneyskaya EV, Kulminskaya AA, et al. Crystal structure of exo-inulinase from *Aspergillus awamori*: the enzyme fold and structural determinants of substrate recognition. Journal of Molecular Biology. 2004 344: 471– 480.

Nurizzo D, Turkenburg JP, Charnock SJ, Roberts SM, Dodson EJ, McKie VA, et al. *Cellvibrio japonicus* alpha-L-arabinanase 43A has a novel five-blade beta-propeller fold. Nat Struct Biol. 2002; 9 (9):665-8.

Pons T, Naumoff DG, Martínez-Fleites C, Hernández L. Three acidic residues are at the active site of a beta-propeller architecture in glycoside hydrolase families 32, 43, 62, and 68. Proteins. 2004; 54 (3):424-32.

Ramachandran GN, Ramakrishnan C, Sasisekharan V. Stereochemistry of Polypeptide Chain Configurations. Journal of Molecular Biology. 1963; 7: 95–99.

Reddy VA, Maley F. Identification of an active-site residue in yeast invertase by affinity labeling and site-directed mutagenesis. The Journal of Biological Chemistry. 1990; 265(19):10817–10820.

Reddy A, Maley F. Studies on identifying the catalytic role of Glu-204 in the active site of yeast invertase. Journal of Biological Chemistry. 1996; 271: 13953–13958.

Ritsema T, Smeekens S. Fructans: beneficial for plants and humans. Current opinion in plant biology. 2003; 6 (3): 223-30.

Ritsema T, Auke V, Irma VI, Smeekens S. Fructosyltransferase mutants specify a function for the β -fructosidase motif of the sucrose-binding box in specifying the fructan type synthesized. *Plant Molecular Biology*. 2004; 54: 853-863.

Ritsema T, Hernández L, Verhaar AJ, Altenbach D, Boller T, Wiemken A, *et al.* Developing fructan-synthesizing capability in a plant invertase via mutations in the sucrose-binding box. *The Plant journal : for cell and molecular biology*. 2006; 48 (2): 228-37 .

Romero J, Huang Q, Pogany J, Bujarski JJ. Characterization of defective interfering RNA components that increase symptom severity of broad bean mottle virus infections. *Virology*. 1993;194(2):576-84.

Rubio-Piña JA, Zapata-Pérez O. Isolation of total RNA from tissues rich in polyphenols and polysaccharides of mangrove plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2011; 14(5), 11.

Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001.

Schroeven L, Lammens W, Van Laere A, Van den Ende W. Transforming wheat vacuolar invertase into a high affinity sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase. *The New phytologist*. 2008; 180 (4): 822-31.

Studer G, Rempfer C, Waterhouse AM, Gumienny R, Haas J, Schwede T. QMEANDisCo—distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics*. 2020; 36 (6): 1765 - 1771.

Schrodinger, L. L. C. The PyMOL molecular graphics system. 2015;Version 1, 8.

Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*. 2021; 38(7):3022–3027

Tamura K, Kawakami A, Sanada Y, Tase K, Komatsu T, Yoshida M. Cloning and functional analysis of a fructosyltransferase cDNA for synthesis of highly polymerized levans in timothy (*Phleum pratense* L.). *Journal of Experimental Botany*. 2009; 60 (3): 893–905.

Tamura K, Sanada Y, Tase K, Komatsu T, Yoshida M. Pp6-FEH1 encodes an enzyme for degradation of highly polymerized levan and is transcriptionally induced by defoliation in timothy (*Phleum pratense* L.). *Journal of Experimental Botany*. 2011; 62 (10): 3421 - 3431.

Ueno K, Ishiguro Y, Yoshida M, Onodera S, Shiomi N. Cloning and functional characterization of a fructan 1-exohydrolase (1-FEH) in edible burdock (*Arctium lappa* L.). *Chemistry Central journal*. 2011; 5(1): 16p.

Van den Ende W, Michiels A, De Roover J, Verhaert P, Van Laere A. Cloning and functional analysis of chicory root fructan1-exohydrolase I (1-FEH I): a vacuolar enzyme derived from a cell-wall invertase ancestor? Mass fingerprint of the 1-FEH I enzyme. *The Plant journal: for cell and molecular biology*. 2000; 24(4): 447–456.

Van den Ende W, Michiels A, Wouterghem D, Clerens SP, De Roover J, Van Laere A. Defoliation induces fructan 1-exohydrolase II in Witloof chicory roots. Cloning and purification of two isoforms, fructan 1-exohydrolase IIa y fructan1-exohydrolase IIb. Mass fingerprint of the fructan 1-exohydrolase II enzymes. *Plant Physiology*. 2001; 126:1186-1195.

Van den Ende W, Clerens S, Vergauwen R, Liesbet Van Riet, Van Laere A, Yoshida M, et al. Fructan 1-Exohydrolases. β -(2,1)-Trimmers during Graminan Biosynthesis in

Stems of Wheat? Purification, Characterization, Mass Mapping, and Cloning of Two Fructan 1-Exohydrolase Isoforms. *Plant Physiology*. 2003a; 131(2): 621–631.

Van den Ende W, De Coninck B, Clerens S, Vergauwen R, Van Laere A. Unexpected presence of fructan 6-exohydrolases (6-FEHs) in non-fructan plants: characterization, cloning, mass mapping and functional analysis of a novel "cell-wall invertase-like" specific 6-FEH from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *The Plant Journal : for cell and molecular biology*. 2003b; 36 (5): 697-710 .

Van den Ende W, De Coninck B, Van Laere A. Plant fructan exohydrolases: a role in signaling and defense?. *Trends in Plant Science*. 2004; 9(11): 523–528.

Van den Ende W, Yoshida M, Clerens S, Vergauwen R, Kawakami A. Cloning, characterization and functional analysis of novel 6-kestose exohydrolases (6-KEHs) from wheat (*Triticum aestivum*). *The New phytologist*. 2005; 166 (3): 917-32.

Van den Ende W. Different evolutionary pathways to generate plant fructan exohydrolases. *J. Exp. Bot.* 2022;73(14):4620-4623.

Vennapusa AR, Somayanda IM, Doherty C, Jagadish SV. A universal method for high-quality RNA extraction from plant tissues rich in starch, proteins and fiber. *Scientific Reports*. 2020; 10. ID 16887.

Verhaest M, Van den Ende W, Le Roy K, De Ranter CJ, Van Laere A, Rabijns A. X-ray diffraction structure of a plant glycosyl hydrolase family 32 protein: fructan 1-exohydrolase IIa of *Cichorium intybus*. *The Plant Journal*. 2005; 41(3): 400–411.

Verhaest M, Lammens W, Le Roy K, De Ranter CJ, Van Laere A, Rabijns A, et al. Insights into the fine architecture of the active site of chicory fructan 1- exohydrolase: 1-kestose as substrate vs sucrose as inhibitor. *New Phytologist*. 2007; 174: 90–100.

Verwoerd TC, Dekker, BMM, Hoekema A. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res.* 1989; 17(6): 2362.

Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research.* 2018; 46 (W1): W296–W303.

Wang L, Stegemann JP. Extraction of high quality RNA from polysaccharide matrices using cetyltrimethylammonium bromide. *Biomaterials.* 2010; 31 (7):1612-8 .

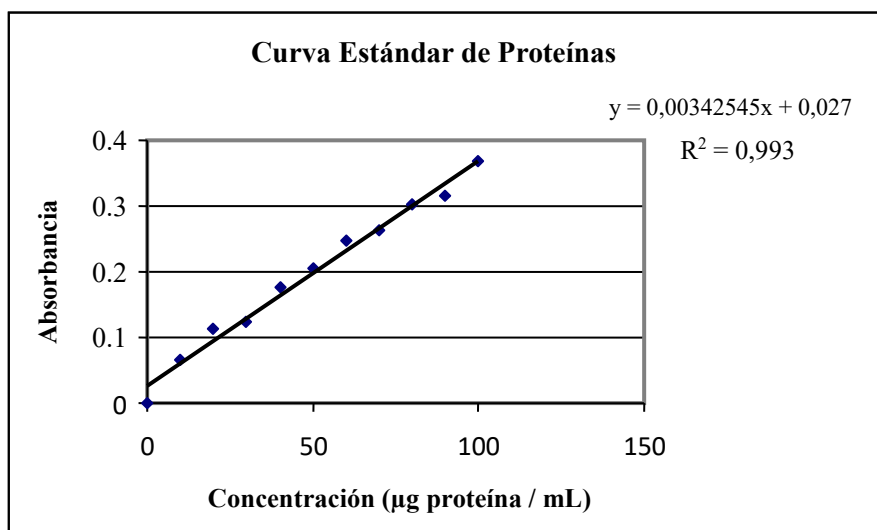
Whelan S, Goldman N. A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Molecular Biology and Evolution.* 2001; 18:691-699.

Xu H, Liang M, Xu L, Li H, Zhang X, Kang J, et al. Cloning and functional characterization of two abiotic stress-responsive Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) fructan 1-exohydrolases (1-FEHs). *Plant Molecular Biology.* 2014; 87: 81 - 98.

Yaffe H, Buxdorf K, Shapira I, Ein-Gedi S, Moyal-Ben ZM, Fridman E, et al. LogSpin: a simple, economical and fast method for RNA isolation from infected or healthy plants and other eukaryotic tissues. *BMC Research Notes.* 2012; 5: 45.

ANEXOS

ANEXO 1. Curva estándar de albúmina de suero bovina (BSA) para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford (1976)



Ecuación de la recta: $y = 0,00342545x + 0,027$

En donde se tiene; $y = \text{Absorbancia } (\lambda=595 \text{ nm})$

$x = \text{Concentración BSA } (\mu\text{g proteína/ mL})$

ANEXO 2. Propiedades químicas de las raíces frescas de cinco entradas de yacón en siete estadios de crecimiento.

Entrada	Mes	Materia seca	Sólidos solubles	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	FOS
ACW 5076	6	14.13	10.6	7.52	8.09	0	65.02
		13.79	10.4	7.8	8.53	0	64.25
		13.48	10.5	7.4	7.83	0	63.5
	7	14.63	10.9	0	4.58	0	70.09
		14.58	11	0	4.74	0	70.83
		14.61	11	0	4.71	0	74.13
	8	14.38	9.4	2.91	9.7	5.7	55.11
		14.38	9.4	2.89	10.06	6.64	54.97
		14.44	9.5	2.9	9.88	6.17	55.04
	9	14.58	12.9	2.78	11.86	4.7	57.87
		14.59	13	3.3	15.77	6.6	59.83
		14.54	13	3.49	15.68	6.58	55.82
	10	12.92	9.6	3.11	12.7	5.78	49.64
		12.83	9.6	4.24	15.6	6.17	51.83
		13.00	9.6	4.1	15.75	6.23	52.43
	11	10.67	7	0.9	18.75	5.57	31.42
		10.86	7.1	0.89	20.55	8.3	36.17
		10.56	7	0.78	19.48	7.89	35.33
	12	8.13	6.5	2.39	33.41	9.34	20.55
		8.38	6.4	2.43	35.57	9.84	21.34
		8.09	6.4	2.28	36.01	10.44	22.14
SAL 136	6	11.46	8.6	14.9	13.96	0	48.12
		11.44	8.8	15.05	14.1	0	53.46
		11.71	8.8	15.31	14.37	0	51.23
	7	12.91	10.2	6.02	4.34	0	68.74
		12.93	10.2	6.12	4.44	0	68.39
		12.87	10.1	5.94	4.11	0	65.8
	8	12.82	9	7.33	11.22	0	52.14
		12.97	9.1	9.55	13.08	0	48.16
		12.84	9	7.37	10.9	0	51.05
	9	12.23	7.9	7.82	17.65	4.79	40.97
		12.14	8	8.07	18.88	5.17	44.7
		12.23	8	8.53	19.14	5.18	44.68
	10	11.52	7.5	7.59	18.99	7.33	43.32
		11.38	7.6	7.56	18.47	7.21	41.31
		11.33	7.6	6.68	15.76	5.99	37.23
	11	8.26	8.4	6.48	27.56	5.67	16.06
		8.28	8.4	5.7	25.67	5.36	17
		8.39	8.4	6.2	26.76	5.39	15.72
	12	6.96	6.1	8.51	34.32	9.74	20.45

DPA 07011		7.19	6	8.57	35.52	10.34	19.21
		7.17	6	7.81	33.36	9.49	17.65
	6	11.92	9.2	11.8	13.93	0	43.08
		12.06	9.3	12.27	14.39	0	42.84
		12.19	9.3	13.89	17.18	0	50.36
	7	14.57	11.6	0	3.86	0	66.86
		14.4	11.6	0	4.39	0	70.48
		14.59	11.5	0	4.34	0	71.73
	8	12.23	9.2	9.81	18.44	0	42.59
		12.17	9.2	9.98	18.81	0	48
		12.36	9.3	9.91	18.56	0	44.59
	9	11.65	7.6	7.24	19.95	6.56	38.81
		11.64	7.6	7.65	21.26	6.97	41.71
		11.5	7.5	7.92	21.78	7.09	41.77
	10	8.03	6.1	11.82	31.81	4.14	18.11
		7.84	6	13.24	37.04	4.78	19.29
		7.93	6	13.04	36.16	4.84	21.02
	11	5.63	5.1	5.39	35.04	0	7.1
		5.86	5	6.34	38.94	0	7.82
		5.81	5	6.29	39.24	0	8.66
	12	6.26	6	11.83	46.08	4.41	7.97
		6.29	5.9	11.89	43.65	4.69	5.96
		6.19	6	12.42	45.23	4.46	5.84
AMM 5163	6	14.92	11	7.76	8.09	7.02	46.65
		14.86	11	7.2	7.33	6.07	45.71
		14.83	11	7.31	7.51	6.18	44.46
	7	16.99	13.3	0	3.65	0	64.77
		16.84	13.4	0	3.71	0	68.56
		16.96	13.4	0	3.91	0	71.14
	8	17.15	10	0	8.2	5.29	58.5
		16.97	10	3.91	8.77	4.52	61.62
		16.84	10.1	0	8.6	4.91	67.7
	9	14.65	7.8	3.55	11.76	5.26	55.36
		14.31	7.8	4.75	14.94	6.52	57.11
		14.4	7.7	4.62	14.94	6.63	56.72
	10	11.9	6	4.01	17.85	5.4	42.28
		11.66	6	4.53	20.19	5.85	46.39
		11.81	6	4.46	20.35	6.03	47.69
	11	10.1	8.2	3.14	27	10.26	29.88
		10	8.2	2.43	22.26	8.75	27.49
		10.04	8.1	2.87	26.14	10.15	28.43
	12	11.1	8.6	3.16	18.34	10.75	41.79
		10.95	8.8	2.21	15.33	9.04	36.73
		11.02	8.8	2.88	18.68	11.1	44.93

AME 5186	6	10.61	10	7.67	7.49	0	55.13
		11.16	9.9	8.02	8.02	0	63.81
		10.82	9.9	8.03	7.94	0	62.03
	7	13.42	10.4	0	6.7	7.73	60.05
		13.65	10.4	0	7.28	8.07	60.71
		13.58	10.4	0	7.49	8.29	62.27
	8	12.97	9.6	5.54	11.96	6.64	45.05
		13.05	9.5	5.67	12	6.83	50.34
		12.95	9.6	5.73	11.97	6.82	50.54
	9	11.76	8.4	7.82	19.08	5.88	39.12
		11.66	8.4	6.69	15.75	5.41	32.36
		11.64	8.4	7.66	18.35	5.72	38.46
	10	10.8	7.7	5.82	20.47	7.28	39.85
		10.73	7.6	5.97	22.19	7.75	40.22
		10.66	7.6	5.91	22.39	8.06	41
	11	8.85	6.2	6.95	23.52	8.69	26.3
		9.09	6.3	6.36	21.9	8.41	24.95
		9.24	6.2	7.28	24.12	8.94	27.76
	12	7.12	7	11.25	30.05	7.68	26.09
		7.18	7.1	11.85	30.53	7.9	27.76
		7.05	7	11.78	31.62	7.9	30.26

ANEXO 3. Análisis estadístico

1. Análisis de varianza para los parámetros vegetativos, químicos y actividades enzimáticas

Parámetro	Tabla/Figura	Análisis	F value/x2	p-valor	Sig.
Número de raíces por planta	Tabla 1.6	ANOVA para accesiones	1.853	0.129	n.s
		ANOVA de medidas repetidas para tiempo	18.95	0.012	*
Peso fresco individual de raíz	Tabla 1.7	ANOVA para accesiones	1.121	0.365	n.s
		ANOVA de medidas repetidas para tiempo	2.738	0.173	n.s
Peso fresco total de raíz	Tabla 1.7	ANOVA para accesiones	0.694	0.599	n.s
		ANOVA de medidas repetidas para tiempo	0.148	0.72	n.s
Diámetro de raíces	Tabla 1.8	ANOVA para accesiones	0.601	0.665	n.s
		ANOVA de medidas repetidas para tiempo	6.386	0.064	n.s
Longitud de raíces	Tabla 1.8	ANOVA para accesiones	1.507	0.225	n.s
		ANOVA de medidas repetidas para tiempo	5.892	0.0722	n.s
Materia seca	Tabla 1.9	ANOVA para accesiones	7.599	<0.001	***
		ANOVA de medidas repetidas para tiempo	88.77	<0.001	***
Contenido de sólidos solubles	Tabla 1.10	Kruskal Wallis para accesiones	10.699	0.03	*
		Kruskal Wallis para tiempo	70.29	<0.001	***
pH	Tabla 1.11	ANOVA para accesiones	0.34	0.849	n.s
		ANOVA de medidas repetidas para tiempo	155	<0.001	***
Acidez titulable	Tabla 1.11	ANOVA para accesiones	0.31	0.869	n.s

		ANOVA de medidas repetidas para tiempo	48.69	0.0022	**
Contenido de fructosa	Tabla 1.12	Kruskal Wallis para accesiones	10.443	0.0336	*
		Kruskal Wallis para tiempo	84.009	<0.001	***
Contenido de glucosa	Tabla 1.13	Kruskal Wallis para accesiones	42.546	<0.001	***
		Kruskal Wallis para tiempo	42.148	<0.001	***
Contenido de sacarosa	Tabla 1.14	Kruskal Wallis para accesiones	22.287	<0.001	***
		Kruskal Wallis para tiempo	42.274	<0.001	***
Contenido de FOS	Tabla 1.15	Kruskal Wallis para accesiones	11.867	0.018	*
		Kruskal Wallis para tiempo	79.357	<0.001	***
Grado de polimerización	Tabla 1.16	ANOVA para accesiones	4.391	0.006	**
		ANOVA de medidas repetidas para tiempo	4.929	0.09	n.s
Actividad enzimática FEH en ACW5076	Figura 1.14	ANOVA para sustrato	2.846	0.123	n.s
		ANOVA para tiempo	0.004	0.95	n.s
		ANOVA para interacción	0.944	0.354	n.s
Actividad enzimática FEH en SAL 136	Figura 1.14	ANOVA para sustrato	5.766	0.0372	*
		ANOVA para tiempo	0.001	0.9762	n.s
		ANOVA para interacción	0.399	0.5417	n.s
Actividad enzimática FEH en DPA 07011	Figura 1.14	Kruskal Wallis para sustrato	0.2	0.654	n.s
		Kruskal Wallis para tiempo	8.0571	0.233	n.s
Actividad enzimática FFT, SST e invertasa en ACW 5076	Figura 1.15	Kruskal Wallis para enzimas	2.98	0.225	n.s
		Kruskal Wallis para tiempo	4.2	0.649	n.s

Actividad enzimática FFT, SST e invertasa en SAL 136	Figura 1.15	ANOVA para enzimas	0.305	0.741	n.s
		ANOVA para tiempo	1.076	0.316	n.s
		ANOVA para interaccion	0.767	0.482	n.s
Actividad enzimática FFT, SST e invertasa en DPA 07011	Figura 1.15	Kruskal Wallis para enzimas	1.66	0.436	n.s
		Kruskal Wallis para tiempo	10.86	0.09	n.s

2. Pruebas post hoc para parámetros significativos

Parámetro	Factor con significancia	Análisis	Grupos	Media	Comparación
Número de raíces por planta	Tiempo	Tukey	6 meses	28.4	A
			7 meses	21.8	ABC
			8 meses	24.3	AB
			9 meses	18.7	ABC
			10 meses	13.1	C
			11 meses	16.9	BC
			12 meses	16.2	BC
Materia seca	Accesiones	Tukey	ACW 5076	12.74	AB
			SAL 136	10.9	BC
			DPA 07011	10.05	C
			AMM 5163	13.72	A
			AME 5186	10.85	BC
	Tiempo	Tukey	6 meses	12.62	AB
			7 meses	14.5	A
			8 meses	13.9	A
			9 meses	12.9	AB
			10 meses	10.95	BC
			11 meses	8.77	C
			12 meses	7.93	C
Contenido de solidos solubles	Accesiones	Multiple comparison after KW	ACW 5076	9.6	A
			SAL 136	8.3	AB
			DPA 07011	7.8	B
			AMM 5163	9.3	AB
			AME 5186	8.4	AB
	Tiempo	Multiple comparison after KW	6 meses	9.9	AB
			7 meses	11.3	A
			8 meses	9.4	AB
			9 meses	9	BC
			10 meses	7.4	C
			11 meses	7	C

			12 meses	6.8	C
pH	Tiempo	Tukey	6 meses	6.074	BC
			7 meses	6.524	A
			8 meses	6.376	AB
			9 meses	6.242	AB
			10 meses	6.152	ABC
			11 meses	6.252	AB
			12 meses	5.718	C
Acidez titulable	Tiempo	Tukey	6 meses	0.0506	AB
			7 meses	0.0718	A
			8 meses	0.0742	A
			9 meses	0.0752	A
			10 meses	0.052	AB
			11 meses	0.0312	B
			12 meses	0.0302	B
Contenido de fructosa	Accesiones	Multiple comparison after KW	ACW 5076	15.2	AB
			SAL 136	18.2	AB
			DPA 07011	25.2	A
			AMM 5163	13.7	B
			AME 5186	17.2	AB
	Tiempo	Multiple comparison after KW	6 meses	10.6	DE
			7 meses	4.8	E
			8 meses	12.2	CDE
			9 meses	17.1	ABCD
			10 meses	21.7	ABC
			11 meses	26.5	AB
			12 meses	32.5	A
Contenido de glucosa	Accesiones	Multiple comparison after KW	ACW 5076	3	C
			SAL 136	8.5	A
			DPA 07011	8.7	A
			AMM 5163	3.3	C
			AME 5186	6.5	AB
	Tiempo	Multiple comparison after KW	6 meses	10.1	A
			7 meses	1.2	C
			8 meses	5.6	AB
			9 meses	6.1	AB
			10 meses	6.9	AB
			11 meses	4.5	BC
			12 meses	7.4	AB
Contenido de sacarosa	Accesiones	Multiple comparison after KW	ACW 5076	5.1	ABC
			SAL 136	3.9	ABC
			DPA 07011	2.3	C
			AMM 5163	6.2	AB
			AME 5186	6.4	A
	Tiempo		6 meses	1.3	C

		Multiple comparison after KW	7 meses	1.6	BC
			8 meses	3.6	BC
			9 meses	6	ABC
			10 meses	6.2	AB
			11 meses	6.2	AB
			12 meses	8.5	A
			ACW 5076	50.8	A
Contenido de FOS	Accesiones	Multiple comparison after KW	SAL 136	41.2	AB
			DPA 07011	33.6	B
			AMM 5163	49.7	AB
			AME 5186	33	AB
	Tiempo	Multiple comparison after KW	6 meses	53.3	AB
			7 meses	67.6	A
			8 meses	52.4	AB
			9 meses	47	BC
			10 meses	39.5	BCD
			11 meses	22.7	D
			12 meses	23.2	D
Grado de polimerización	Accesiones	Tukey	ACW 5076	3.857	A
			SAL 136	3.271	AB
			DPA 07011	2.771	B
			AMM 5163	3.671	A
			AME 5186	3.185	AB
Actividad enzimática FEH en SAL 136	Sustrato	Tukey	Kestosa	26.03	A
			Inulina	11.02	B

3. Análisis de regresión múltiple. Contenido de FOS , fructosa, glucosa y sacarosa en todas las accesiones durante las 6 cosechas (Figura 1.8)

```
call:
lm(formula = FOS ~ fruc + glu + sac)

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-14.9937  -3.3771   0.9912   4.3286  13.1431

Coefficients:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)  73.54801    1.52028  48.378  <2e-16 ***
fruc         -1.47969    0.07693 -19.234  <2e-16 ***
glu          -0.23402    0.18974  -1.233   0.2203
sac          -0.41729    0.21018  -1.985   0.0498 *
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 6.274 on 101 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.8779,    Adjusted R-squared:  0.8743
F-statistic: 242.1 on 3 and 101 DF,  p-value: < 2.2e-16
```

4. Modelo Lineal Generalizado (GLM) para la correlación FOS-Azúcares

BASE DE DATOS

¿Qué familia y link (funcion enlace) usar?

' * FOS: es un porcentaje continuo (0–100 %).

* Si los valores se concentran lejos de 0 y 100 ⇒

Gaussiana con link “identity” es razonable.

* Si hay muchos ceros o valores cercanos a 0 ⇒

Beta o Gamma con log-link.'

```
# Modelo Gamma Original:
```

```
tidy(m_gamma, conf.int = TRUE, exponentiate = TRUE) %>%  
  mutate(across(estimate:conf.high, ~round(., 3)))
```

```
' Resultados:
```

```
# A tibble: 4 × 7  
  term          estimate std.error statistic p.value conf.low conf.high  
  <chr>          <dbl>    <dbl>    <dbl>   <dbl>   <dbl>   <dbl>  
1 (Intercept)    83.4      0.047     93.2     0      76.2    91.5  
2 fructosa        0.946     0.002    -23.3     0      0.941    0.951  
3 glucosa         1.02     0.006     2.96  0.004    1.01     1.03  
4 sacarosa        1.03     0.007     4.64     0      1.02     1.04 '
```

```
' Interpretacion:
```

```
 dispersion ratio = 0.724
```

```
 Interpretacion: ACEPTABLE y no problematico.
```

```
* p-value = 0.12
```

```
p-value = 0.12 > alfa = 0.05 --> NRHo
```

```
NO hay evidencia de SOBREDISPERSION.'
```

```
# Conclusiones:
```

```
' El modelo GAMMA(log):
```

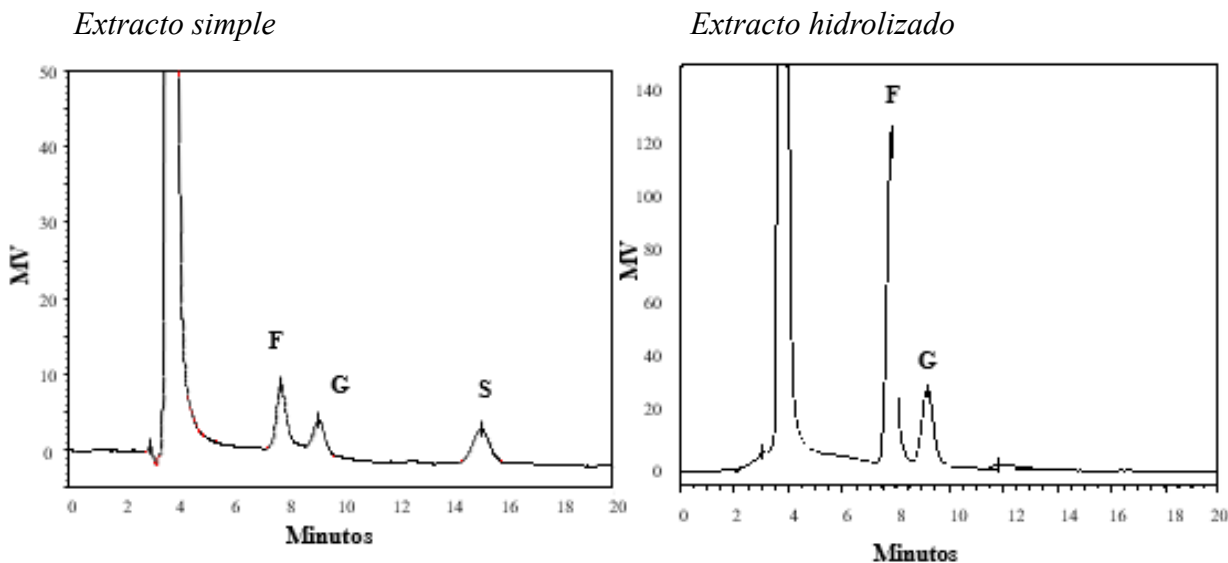
- Residuales o residuos razonables.
- Varianza compatible con la Gamma.
- pvalues validos
- Estadisticamente solido.'

ANEXO 4. Actividad enzimática FEH, FFT, SST e invertasa de las raíces de tres accesiones de yacón en siete estadios de crecimiento.

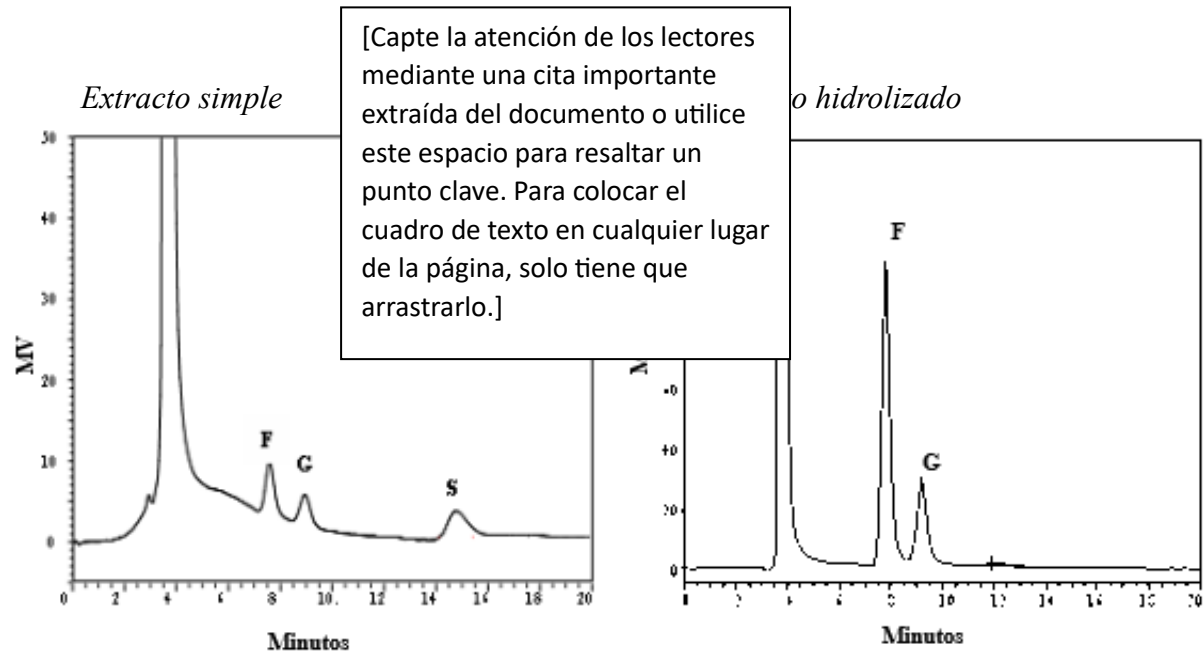
Accesion	Edad del Cultivo (Meses)	Actividad Enzimática ($\mu\text{g producto/mg proteína / min}$)				
		FEH ^(a)	FEH ^(b)	FFT	SST	Invertasa
ACW5076	6	2.693	23.037	N.D.	41.288	0.598
	7	2.772	11.319	36.031	13.167	1.157
	8	22.466	9.029	N.D.	22.270	2.809
	9	5.792	16.344	N.D.	19.653	2.069
	10	4.020	16.974	N.D.	N.D.	3.350
	11	11.091	18.257	N.D.	N.D.	11.603
	12	10.891	7.103	1.894	N.D.	0.476
SAL136	6	17.082	25.005	29.461	10.150	21.291
	7	18.502	20.704	31.275	28.632	17.840
	8	25.530	11.131	4.174	4.872	13.913
	9	0.375	38.964	N.D.	30.721	5.245
	10	19.029	16.203	24.172	N.D.	4.374
	11	16.096	12.966	23.026	17.437	7.377
	12	3.537	27.239	N.D.	26.177	16.272
DPA07011	6	17.649	14.544	34.713	31.832	20.032
	7	16.179	6.751	3.586	1.899	2.109
	8	8.234	11.086	3.824	168.732	4.709
	9	21.839	25.220	26.770	222.617	4.509
	10	57.616	181.865	51.520	N.D.	34.528
	11	9.831	15.336	N.D.	N.D.	3.765
	12	6.920	40.025	10.683	N.D.	8.638
(a) Sobre sustrato Inulina		(b) Sobre sustrato kestosa				

ANEXO 5. Cromatogramas HPLC del extracto de azúcares de las raíces de cinco accesiones de yacón en el séptimo mes de crecimiento de las plantas.

ACW 5076

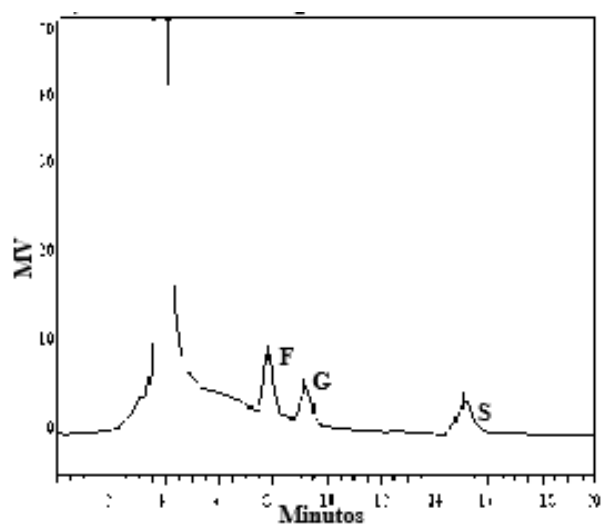


SAL 136

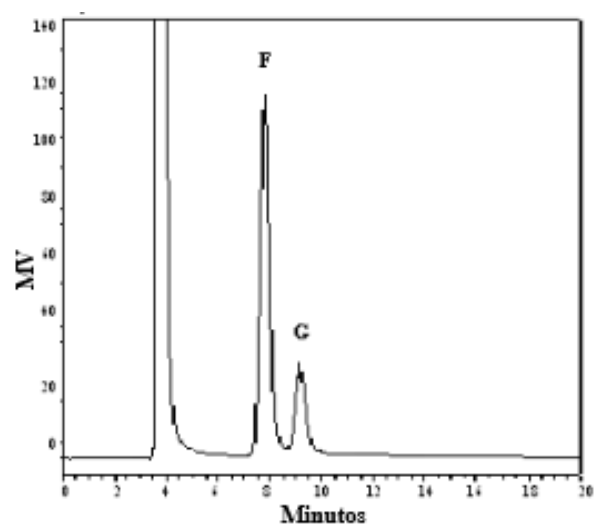


DPA 07011

Extracto simple

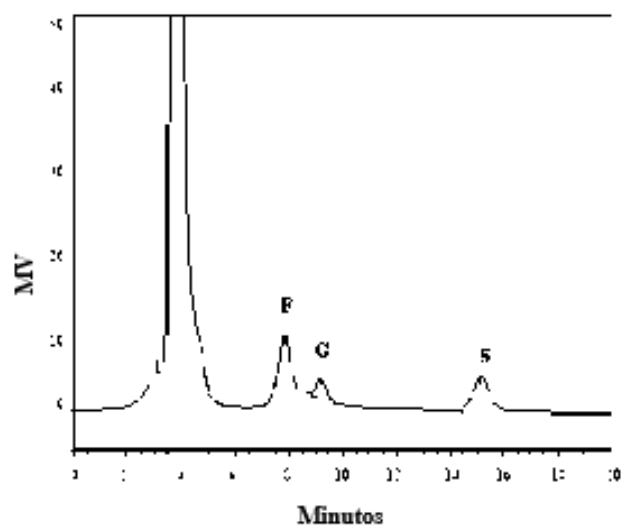


Extracto hidrolizado

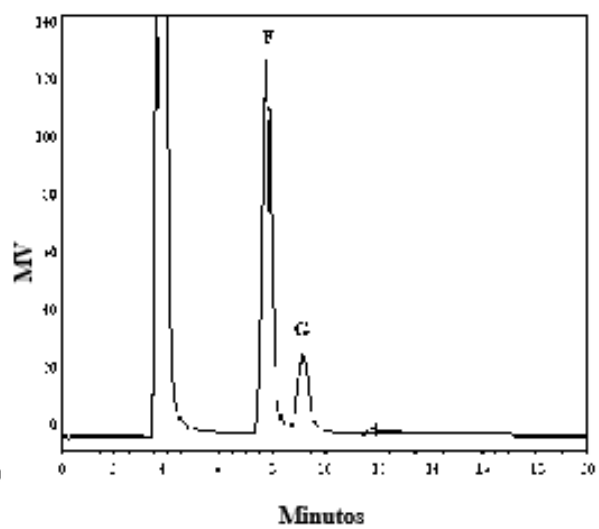


AMM 5163

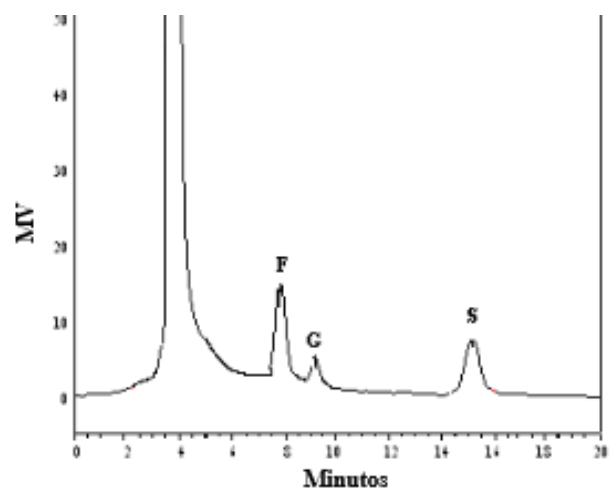
Extracto simple



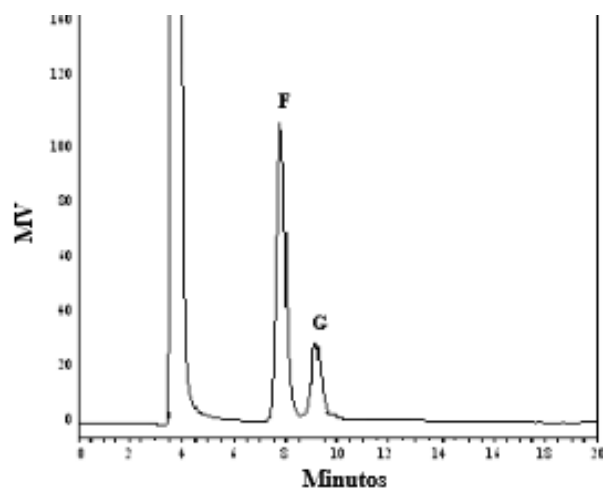
Extracto hidrolizado



Extracto simple



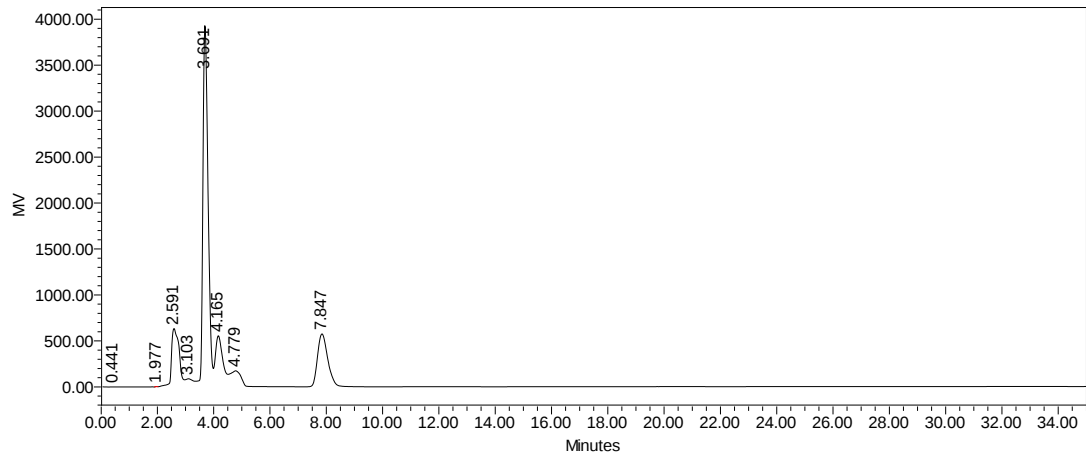
Extracto hidrolizado



ANEXO 6. Cuadros de especificidad de sustrato con la enzima FEH

Sustrato: SACAROSA

Blanco



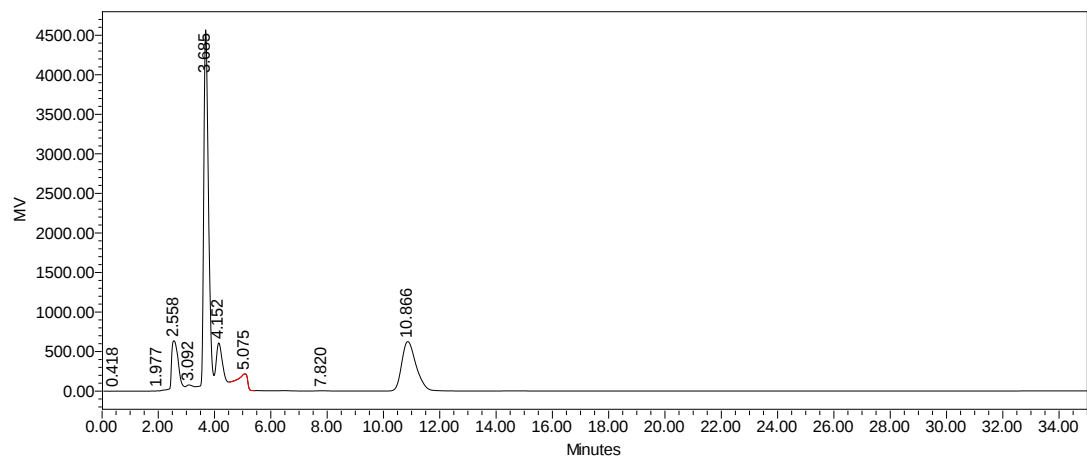
	Name	Retention Time	Area	% Area	Height	Resultados (mg/100ml)
1		0.441	99885	0.11	1819	
2		1.977	22748	0.02	3986	
3		2.591	12006957	12.8	635026	
4		3.103	1745803	1.86	87328	
5		3.691	50421626	53.76	3944604	
6		4.165	10453012	11.15	553939	
7		4.779	4624819	4.93	171654	
8	Sacarosa	7.847	14415813	15.37	574596	1.4866151

Muestra

	Name	Retention Time	Area	% Area	Height	Resultados (mg/100ml)
1		0.473	98953	0.11	1760	
2		1.973	21680	0.02	3757	
3		2.575	12009631	13.09	630977	
4		3.102	1723296	1.88	86593	
5		3.684	49989463	54.47	3984726	
6		4.154	10037158	10.94	539029	
7		4.808	4758022	5.18	159956	
8	Fructosa	5.539	73855	0.08	3471	0.06317
9	Glucosa	6.532	413773	0.45	20801	0.0992153
10	Sacarosa	7.822	11663849	12.71	462880	1.2141434
11	Kestosa	10.942	978087	1.07	28466	0.1565087

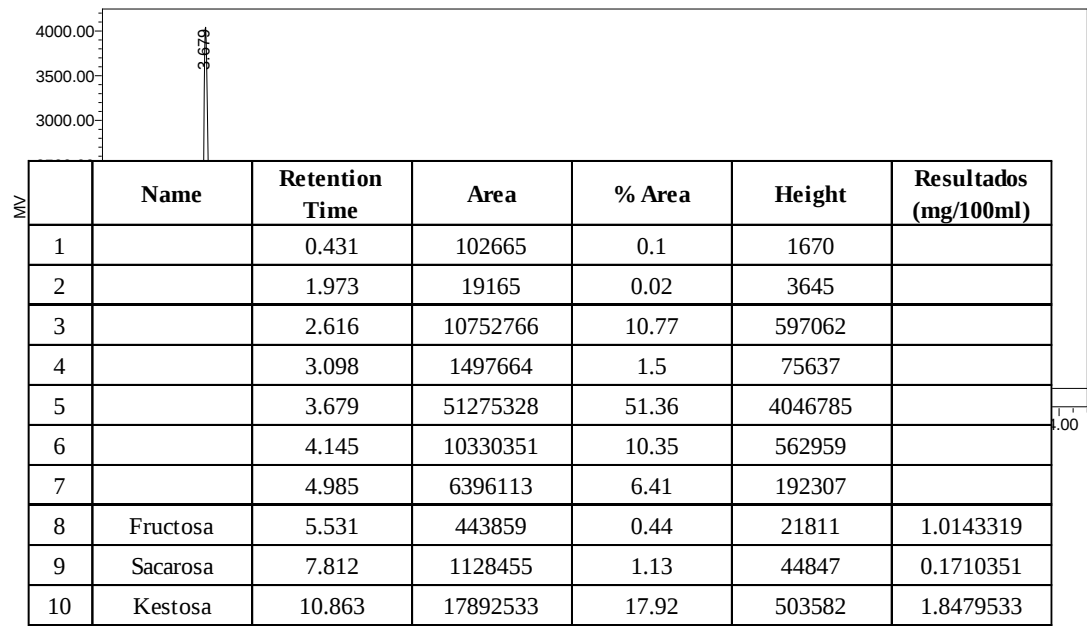
Sustrato: KESTOSA

Blanco



	Name	Retention Time	Area	% Area	Height	Resultados (mg/100ml)
1		0.418	92667	0.09	1595	
2		1.977	19849	0.02	3655	
3		2.558	10870721	10.31	636203	
4		3.092	1422250	1.35	76141	
5		3.685	54217764	51.4	4564822	
6		4.152	10539373	9.99	605513	
7		5.075	6407109	6.07	212148	
8	Sacarosa	7.82	50586	0.05	2375	0.0643154
9	Kestosa	10.866	21863627	20.73	624137	2.2450627

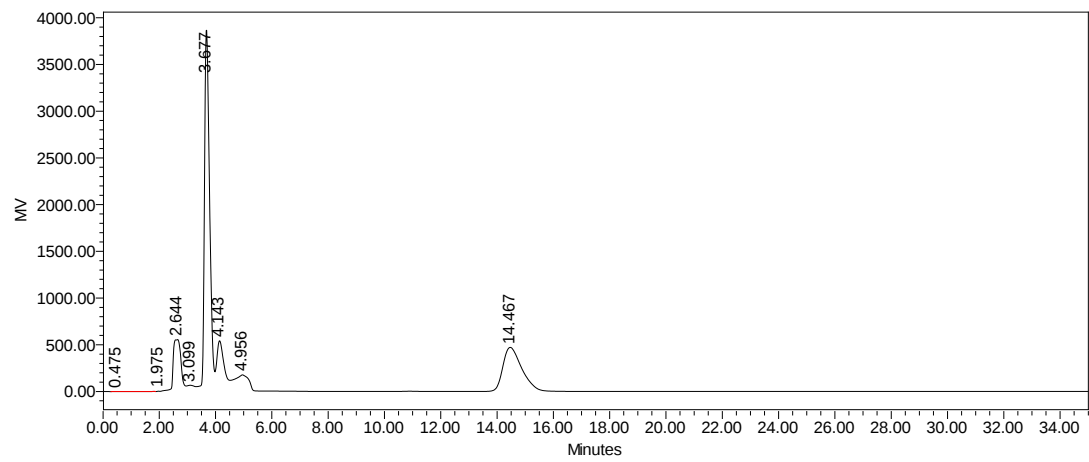
Muestra



	Name	Retention Time	Area	% Area	Height	Resultados (mg/100ml)
1		0.431	102665	0.1	1670	
2		1.973	19165	0.02	3645	
3		2.616	10752766	10.77	597062	
4		3.098	1497664	1.5	75637	
5		3.679	51275328	51.36	4046785	
6		4.145	10330351	10.35	562959	
7		4.985	6396113	6.41	192307	
8	Fructosa	5.531	443859	0.44	21811	1.0143319
9	Sacarosa	7.812	1128455	1.13	44847	0.1710351
10	Kestosa	10.863	17892533	17.92	503582	1.8479533

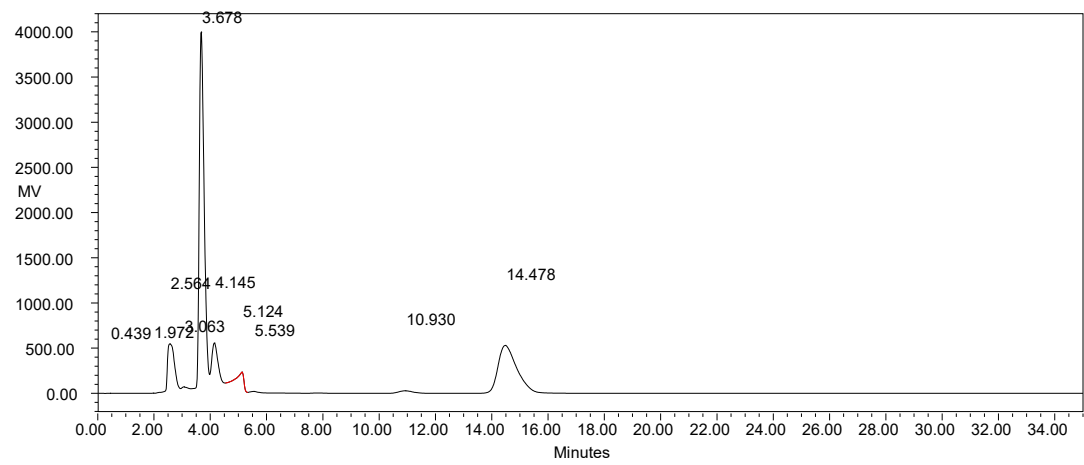
Sustrato: NISTOSA

Blanco



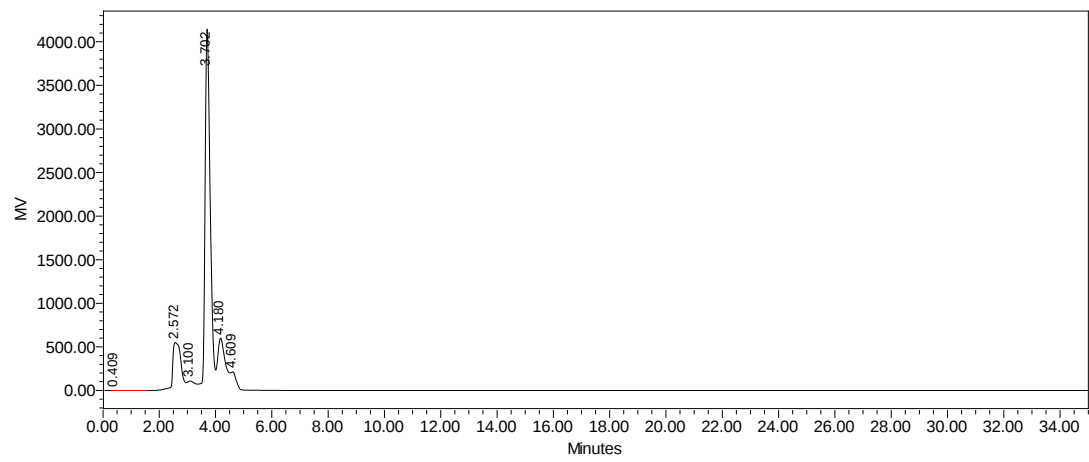
	Name	Retention Time	Area	% Area	Height	Resultados (mg/100ml)
1		0.475	97039	0.1	1627	
2		1.975	19506	0.02	3454	
3		2.644	10683444	10.74	555282	
4		3.099	1307443	1.31	65309	
5		3.677	49370286	49.65	3873205	
6		4.143	9940567	10	540401	
7		4.956	6357384	6.39	173872	
8	Nistosa	14.467	21660834	21.78	470139	2.4554512

Muestra



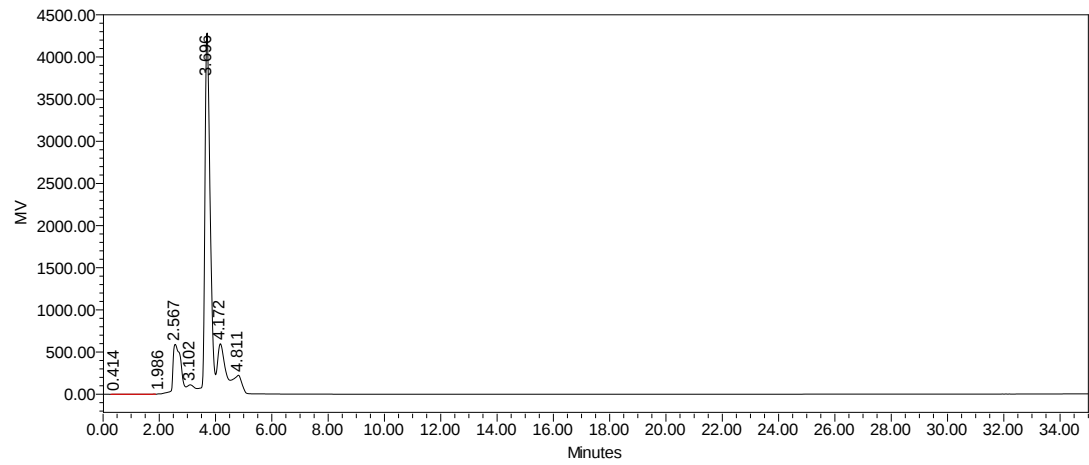
Sustrato: INULINA

Blanco



		Name	Retention Time	Area	% Area	Height	
	1		0.409	59735	0.07	1457	
	2		2.572	11371514	14.05	549589	
	3		3.1	2171265	2.68	107360	
	4		3.702	52748377	65.18	4142528	
	5		4.18	11661165	14.41	596592	0.8956514
	6		4.609	2921265	3.61	210573	0.1485578
10		Nistosa	14.478	24249049	23.42	527577	2.7414418

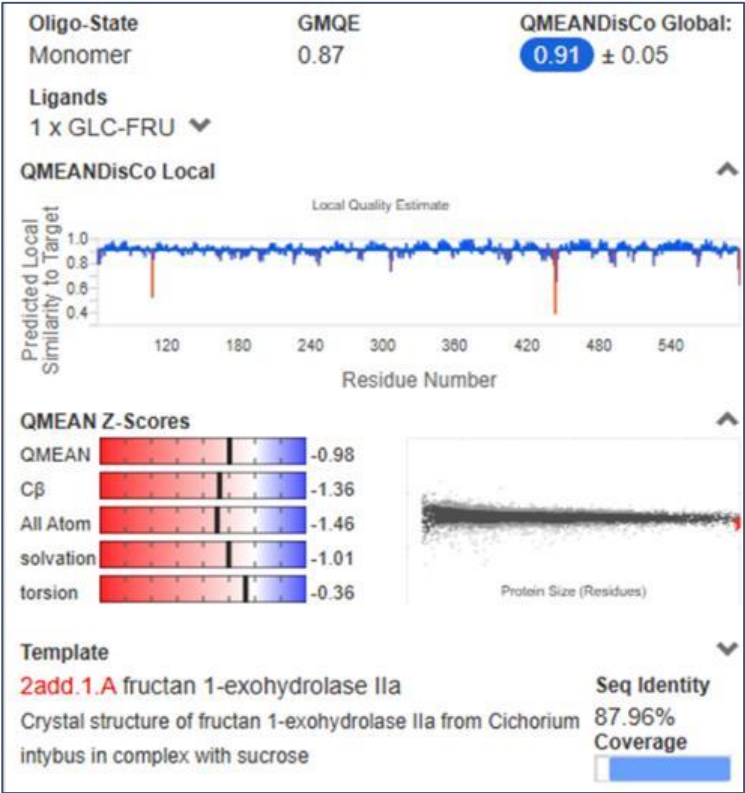
Muestra



	Name	Retention Time	Area	% Area	Height
1		0.414	77651	0.09	1586
2		1.986	22890	0.03	4062
3		2.567	11575170	13.48	590922
4		3.102	2166567	2.52	109705
5		3.696	55454836	64.58	4287814
6		4.172	11336723	13.2	595870
7		4.811	5233895	6.1	221252

ANEXO 7.

7.1. Reporte de validación del Modelo por homología del gen 1-FEH de yacón (SWISS Model)



7.2. Diagrama de Ramachandran para la validación de la calidad del modelo de la 1-FEH de yacón

