



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

OBTENCIÓN DE INULINASAS.

Identificación y caracterización de cepas que emplean inulina
ramificada como única fuente de carbono.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

Jessica Monserrat Robert Rivera



México, D.F., octubre de 2013.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: María Del Carmen Wachter Rodarte

VOCAL: Profesora: Gloria Díaz Ruiz

SECRETARIO: Profesora: Carmina Montiel Pacheco

1er. SUPLENTE: Profesora: Norma Angélica Camacho De La Rosa

2° SUPLENTE: Profesora: Beatriz Ruiz Villafan

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 314, FACULTAD DE QUÍMICA. UNAM.
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA.**

ASESOR DEL TEMA:

CARMINA MONTIEL PACHECO

SUSTENTANTE:

JESSICA MONSERRAT ROBERT RIVERA

Contenido

Resumen.....	5
Antecedentes.....	6
<i>Agave tequilana</i>	6
<i>Carbohidratos</i>	6
<i>Fructanos</i>	7
<i>Inulina y fructooligosacáridos (FOS)</i>	9
<i>Enzimas</i>	14
<i>Inulinasas</i>	17
<i>Modelo de Monod</i>	21
<i>Identificación del microorganismo por ITS-PCR</i>	23
Justificación.....	29
Hipótesis.....	30
Objetivo General.....	30
Objetivos particulares.....	30
Metodología.....	31
Materiales y metodología.....	32
<i>Preparación y esterilización de medios</i>	32
<i>Selección de cepas y preparación de preinóculo</i>	32
<i>Inoculación e incubación de medios</i>	33
<i>Toma de muestras y análisis de crecimiento</i>	33
<i>Determinación de azúcares reductores por la técnica de Miller</i>	33
<i>Cromatografía de líquidos en capa fina</i>	33
<i>Determinación de proteína</i>	34

Resultados y discusión.	36
<i>Selección de Microorganismos Consumidores de Inulina de Agave...</i>	36
<i>Evaluación del crecimiento microbiano por densidad óptica y peso seco.</i>	37
<i>Determinación de consumo de inulina de agave en el medio.</i>	39
<i>Efecto de la concentración de inulina de agave en el crecimiento de IS03.</i>	44
<i>TLC del consumo de inulina del microorganismo seleccionado.</i>	47
<i>Ensayo para la cuantificación enzimática.</i>	49
<i>Determinación de proteína por el método de Bradford.</i>	52
<i>Identificación de la cepa IS03</i>	53
Conclusiones.....	60
Perspectivas finales.	61
Referencias.....	62
Anexo 1. Determinación de azúcares reductores por la técnica de Miller o DNS.	65
Anexo 2. Cromatografía de líquidos en capa fina.	68
Anexo 3. Determinación de proteínas por el método de Bradford.	70
Anexo 4. PCR.	72

Resumen.

La inulina es un polisacárido compuesto por unidades de fructosa unidas por enlaces β -(2-1) y que presenta una glucosa terminal unida por su carbono 1. Este biopolímero de reserva para diversos géneros vegetales, puede ser usado para la producción de fructosa y/o sus derivados, o bien para la producción de inulooligosacáridos (IOS). Estos últimos han sido estudiados ampliamente por su capacidad prebiótica, lo que les ha valido un uso amplio en diversos alimentos y en consecuencia les ha dado un gran valor agregado. Existen fuentes de inulinas de especies autóctonas de México cuya estructura es altamente ramificada y por tanto su uso está limitado por la falta de enzimas capaces de degradar este tipo de polímeros. Por ejemplo el agave utilizado en la producción de tequila, contiene hasta un 25% de este biopolímero, que es estructuralmente distinto a aquel de la achicoria, siendo este último lineal y mayormente usado en la producción de IOS. No obstante, a la fecha existen pocos reportes de inulinasas capaces de degradar inulinas ramificadas a fructosa y menos a IOS por la acción de endo-inulinasas.

Cabe señalar, que las inulinasas tienen un enorme potencial de uso industrial, por lo que la información generada en este trabajo será de enorme interés para futuros proyectos. Nuestro grupo de trabajo se ha dado a la tarea de aislar de forma sistemática, microorganismos capaces de utilizar inulina de agave como única fuente de carbono. Se cuenta con una colección de cepas que cumplen con este criterio de selección. Estos organismos incluyen procariotes y eucariotes de distintos orígenes. En este trabajo se caracterizó la capacidad de degradación de la inulina de agave de una de las cepas aisladas en el laboratorio, así como su identificación.

Antecedentes.

Agave tequilana.

El género Agave es una monocotiledónea endémica de América. De sus aproximadamente 200 especies, más del 75%, se encuentran en México. En nuestro país, los agaves tienen gran importancia económica y cultural, ya que se han aprovechado durante siglos como fuente de alimento, bebida, medicina, combustible, entre otros usos. El género Agave tiene una amplia distribución en el territorio mexicano (más del 75%), sin embargo, su distribución es altamente asimétrica.

El agave tequilana Weber, es una planta xerófila (que crece en zonas áridas y cálidas) de hojas de color azul-verdoso, delgadas y casi planas; mide aproximadamente 1.25 m de largo y 10 cm de ancho y tiene una espina terminal de color rojo oscuro de 2 cm.

El tequila es uno de los aguardientes más famosos de México y a nivel mundial, cuyo consumo se ha incrementado en los últimos años. Se obtiene a partir de la planta de Agave tequilana Weber, mejor conocido como Agave azul. La parte utilizada para la elaboración del tequila es la piña.

El tequila se clasifica en dos tipos de acuerdo a su elaboración: tequila 100% de agave, es en el que se usan exclusivamente los azúcares del Agave tequilana Weber var. Azul para su producción y el tequila, al que se le adicionan hasta un 49% de otros azúcares que no son de agave como glucosa, piloncillo o sacarosa (Calderón, 2013).

Carbohidratos.

Los carbohidratos son moléculas formadas por carbono, hidrógeno y oxígeno. Todos los carbohidratos son azúcares pequeños, solubles en

agua (glucosa y fructosa, por ejemplo) o bien cadenas, como el almidón y la celulosa, que se elaboran enlazando subunidades de azúcar (Audesirk et al. 2003).

En la naturaleza, los carbohidratos se presentan como monosacáridos (azúcares simples), oligosacáridos (contienen de dos a diez unidades monosacáridas) y polisacáridos (glúcidos poliméricos más grandes). Los monosacáridos se clasifican en aldosas si tienen grupo aldehído y cetosas si tienen un grupo cetona. Todos los monosacáridos, aldosas o cetosas y la mayoría de los disacáridos son azúcares reductores (excepto la sacarosa) porque uno de sus dos carbonos anoméricos no está formando enlace glucosídico (Berg et al. 2008).

Fructanos.

Se le llama fructano a cualquier compuesto en el que los enlaces fructosil-fructosa representan la mayoría de los enlaces. Incluso aunque la regla original decía que la terminación "ano" se refiere a los polímeros de más de 10 unidades, el término fructano es usado para nombrar a las moléculas que tienen en su mayoría residuos de fructosa, sin importar el número, lo que incluye el dímero de fructosa-fructosa o inulobiosa (Waterhouse et al. 1993).

Los fructanos proveniente de plantas o microorganismos son una combinación de oligómeros y polímeros. Estos se clasifican mediante promedio y el máximo número de unidades de fructosa conocidos como grado de polimerización promedio (DP) y máximo grado de polimerización (DP máximo) respectivamente.

En los fructanos, los enlaces entre una unidad de glucosa y de fructosa, es siempre β (2-1), mientras que, como se mencionó, los enlaces

fructosil-fructosa son β (1-2) o β (1-6). En los fructanos ramificados los enlaces que generan la ramificación son usualmente β (2-6) (López, 2012).

Estos compuestos tienen principalmente un origen vegetal, pero también pueden ser encontrados en hongos y en bacterias. Los fructanos de origen vegetal tienen pocos residuos de fructosa y no exceden las 200 unidades de fructosa. Las bacterias por su parte sintetizan fructanos de hasta 100,000 unidades y son muy ramificados.

Las generalidades para describir a los fructanos son las siguientes:

- Inulina. Es un compuesto que tiene en su mayoría o exclusivamente enlaces β (1-2) entre las unidades de fructosa y en algunos casos una glucosa en una posición terminal. Por lo general, la inulina es totalmente lineal, pero en algunos casos puede poseer un pequeño grado de ramificación (1-2%).

Todos los fructanos en las dicotiledóneas y solo una parte de los fructanos en los monocotiledoneos son tipo inulina. La inulina también existe en una forma cíclica que posee 6, 7 u 8 unidades de fructosa (Kawamara et al. 1989).

- Levana. Es un compuesto que posee en su mayoría o exclusivamente enlaces β (6-2) entre sus unidades de fructosa. La levana puede o no tener una unidad de glucosa terminal. Este tipo de fructanos se encuentra en su mayoría en bacterias pero también es encontrado en menos grado en plantas. En plantas son cadenas de pocas unidades de fructosa y un alto grado de ramificación a través de enlaces β (1-2) (Waterhouse et al. 1993).

Inulina y fructooligosacáridos (FOS).

La inulina es un polisacárido constituido de unidades de fructosa y generalmente posee un residuo terminal de glucosa, algunos autores consideran que los polisacáridos de fructosa mayores de 10 unidades pueden considerarse como inulina. Sin embargo, algunos otros argumentan que la inulina es una mezcla de fructanos de longitudes diversas y que así se encuentra en la naturaleza. Este polisacárido se extrae comercialmente de vegetales como la achicoria y la dalia, pero está presente en la alcachofa, el diente de león, la cebolla, el ajo y en los espárragos (Ricca et al. 2007).

La inulina es un polímero polidisperso contenido en las plantas. Su descubrimiento data ya de por lo menos unos 5000 años y su uso de unos 2000. Fue reportada por primera vez por Pedanio Dioscoridio, un médico del ejército romano quien elogiaba la achicoria por sus beneficios a la salud, principalmente estómago, hígado y riñones. Finalmente en el siglo XIX la inulina fue descubierta por un científico Alemán cuando aisló una sustancia peculiar de origen vegetal de un extracto de agua hirviendo de *Inula helenium*, llamándola a su vez Inulina (Franck, 2002).

Alrededor del 15% de las especies de plantas contienen fructanos, y en algunas de éstas constituyen la única fuente de reserva de carbohidratos. Los fructanos son oligómeros o polímeros compuestos por unidades de fructosa, comúnmente solubles en agua y sintetizados a partir de la acumulación de sacarosa en vacuolas (Vijn et al. 1999). Existen fructanos específicos que se encuentran en ciertas especies de plantas, y su presencia está altamente influenciada por las condiciones ambientales y por la etapa de desarrollo de la planta misma (Sims et al. 2001). Estos compuestos están presentes como una mezcla de macromoléculas con diferentes grados de polimerización (DP) y

presentan además algunas diferencias estructurales. Dependiendo del tipo de enlace que contengan se pueden clasificar como inulinas si predominan los enlaces β -(2-1), o bien como levanas cuando los enlaces predominantes son β -(2-6). Sin embargo, existe una variedad de estructuras complejas ramificadas que se derivan de las dos anteriores, particularmente con enlaces β -(2-6) en el caso de las inulinas neoserie, que además contiene una unidad de glucosa entre dos unidades de fructosa, y β -(2-1) para las levanas neoserie (Muñoz-Gutiérrez et al. 2009). Las inulinas generalmente están compuestas por cadenas lineales de 25 a 30 residuos de fructosa.

Los fructanos de Agave tequilana son carbohidratos de reserva. Los polifruktanos presentes en el agave tienen estructuras altamente ramificadas de inulina neoserie, con unidades de glucosa interna y externa. El alto grado de ramificación y la particularidad de la estructura de las inulinas de diferentes especies de agave ha llevado a renombrarla como agavina (Fig. 1) (Mancilla et al. 2006).

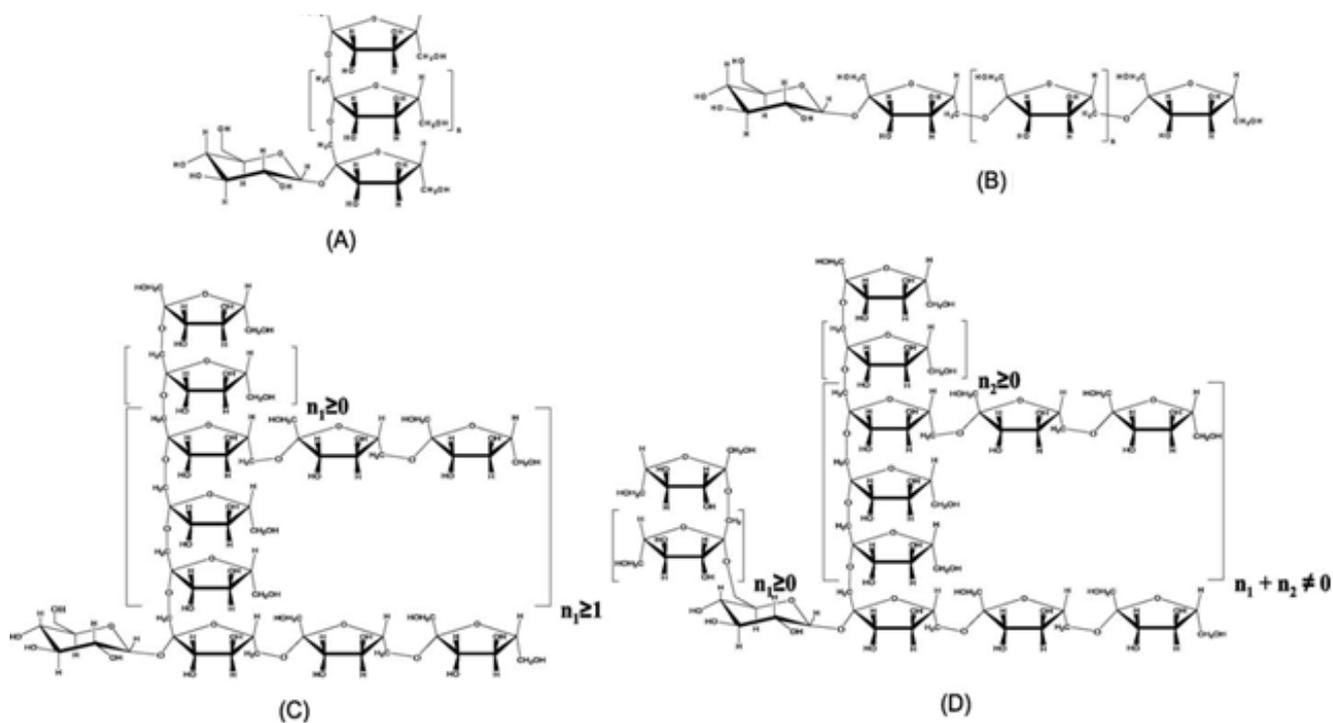


Figura 1. Estructuras de la familia de las inulinas. (A) Inulina. (B) Levana. (C) Graminan. (D) Agavina (Muñoz-Gutiérrez et al. 2009).

Como se mencionó anteriormente la función biológica de la inulina es la de reserva de energía y se localiza principalmente en las raíces y los tubérculos de las plantas, aunque, dependiendo de la especie, se puede distribuir en las hojas, bulbos, etc. En la tabla 1 se muestra la cantidad de inulina en diferentes partes de diversas plantas.

Tabla 1. Contenido promedio de inulina en diferentes especies vegetales (Van Loo et al., 1995).

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

La inulina es insoluble en agua fría, y en agua a 10° C tiene una solubilidad del 10%, mientras que a 90° C se solubiliza 35%. Se hidroliza en medio ácido a altas temperaturas (70-80° C), pero se hidroliza en fructosa y oligosacáridos en condiciones suaves con inulinasas microbianas y vegetales.

La inulina puede emplearse como ingrediente funcional en los alimentos, pues se considera un prebiótico entre algunos otros beneficios que aporta su consumo, además si se hidroliza enzimáticamente se pueden obtener fructooligosacáridos que también poseen propiedades prebióticas y poseen dulzor de entre 30-50% comparado con la sacarosa. La inulina es una fuente potencial de fructosa y podrían prepararse jarabes con un porcentaje mayor al 90%, con menos pasos enzimáticos comparados con los jarabes de fructosa elaborados con almidón de maíz. Para hidrolizar la inulina hasta fructosa pueden emplearse métodos fisicoquímicos, pero las condiciones drásticas producen compuestos coloridos y de dulzor nulo. Los métodos enzimáticos no producen compuestos indeseables y se puede alcanzar alta eficiencia en la hidrólisis (Singh et al. 2006).

Los inuliooligosacáridos (IOS) producidos a partir de la inulina tienen estructuras químicas y funcionalidades fisiológicas similares a las de los fructooligosacáridos (FOS) (Kaur et al. 2002). En respuesta a la demanda creciente de consumidores de alimentos sanos y bajos en calorías, se han explorado las funcionalidades de estos compuestos. Se ha reportado que los IOS aumentan la población de bifidobacterias en el intestino. También se ha propuesto que el predominio de estas bacterias en el intestino grueso tiene un gran potencial para contribuir en la prevención de muchas enfermedades y mantener la salud en general (Sumat et al. 2012). Estos compuestos también ayudan en la síntesis de vitaminas B y en la absorción de ciertos iones como calcio y magnesio. Especialmente los pentámeros (IOS₅) y hexámeros (IOS₆) presentan aplicaciones y beneficios hacia la salud, lo cual incluye, activación del sistema inmune, disminución de los niveles de colesterol, prevención de diabetes y control del metabolismo de lípidos entre otros (Nguyena et al. 2011).

Cuando un FOS tiene un grado de polimerización de al menos 30 unidades de fructosa, es llamado inulina. Esto corresponde a un peso molecular de 5400 Da. La longitud de las cadenas de la inulina depende de la variedad de la planta y de la estación del año, por lo cual, grados de polimerización más altos y bajos están presentes en los polifruktanos de la misma planta. De acuerdo a estas variaciones, el peso molecular de la inulina caería entre los 3500-5500. El grado de polimerización y el nivel de ramificación son determinados por el origen de la inulina (Madrigal et al. 2007).

Una excelente alternativa para la producción de IOS consiste en el aprovechamiento integral de las plantas de agave, particularmente los residuos de la producción del tequila como son las hojas.

Además, la inulina y los IOS tienen una amplia aplicación en alimentos como son los derivados de la confitería, las preparaciones de fruta, los postres de leche, el yogurt, la repostería, los helados, los chocolates y las salsas (Madrigal et al. 2007; Kaur et al. 2002). Los IOS son de una a tres veces más dulces que la sacarosa, no son cariogénicos y no son usados como fuente de energía por el organismo, por lo tanto son adecuados para ser consumidos por diabéticos o personas en regímenes alimenticios controlados (Chacón, 2006).

Enzimas.

Las enzimas pertenecen a un grupo de macromoléculas biológicas llamadas proteínas. Las proteínas son las moléculas orgánicas más abundantes del cuerpo humano y tienen funciones muy variadas dentro del mismo, por lo que se encuentran en cada célula de este. Entre las funciones de las proteínas, están la de catálisis, de reserva, de transporte, de regulación, estructurales o hasta de defensa como los anticuerpos.

Las enzimas son proteínas especializadas en la catálisis de reacciones biológicas. Debido a que las enzimas tienen una gran especificidad y poder catalítico, estas catalizan casi todas las reacciones que se llevan a cabo en el cuerpo humano.

En cuanto a su nomenclatura, todas las enzimas comienzan con las iniciales E. C., las cuales corresponden a las palabras enzyme commission, seguido de la especificación de reacción, especificación estructural y finalmente especificación óptica, una vez nombradas y clasificadas las enzimas se enlistan en **Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)**.

En este sistema, las enzimas se dividen en seis clases mayores, según la reacción que catalicen, divididas a su vez en subclases numéricas y sub-subclases de acuerdo a las reacciones individuales que las envuelven (Bernard et al. 1991).

1. Óxido-reductasas: Cataliza reacciones de óxido-reducción.
2. Transferasas: Cataliza reacciones de transferencia de grupos funcionales.
3. Hidrolasas: Catalizan reacciones de hidrólisis.
4. Liasas: Catalizan reacciones de adición a los dobles enlaces.
5. Isomerasas: Catalizan reacciones de isomerización.
6. Ligasas: Catalizan reacciones de formación de enlaces con hidrólisis del ATP.

Las enzimas que catalizan la hidrólisis son hidrolasas y estas a su vez se clasifican dependiendo del tipo de sustrato de la enzima en los siguientes subgrupos:

- 3.1 Esteres.
- 3.2 Enlaces glucosídicos.
- 3.3 Enlaces peptídicos.
- 3.4 Otros enlaces C-N.
- 3.5 Anhídridos de ácido.

Dentro de las inulinasas existen dos tipos de enzimas que actúan sobre el mismo sustrato pero de manera diferente. Así existen enzimas que tienen actividad endohidrolíticas y otras que tienen actividad exohidrolíticas. Las enzimas de actividad exohidrolítica, reconocen el final de una cadena polimérica e hidrolizan la unidad terminal del polímero, liberando así sólo una unidad y dejando el polímero con una

unidad menos. Este tipo de enzimas sólo actúa en extremos terminales de la cadena. Las enzimas que tienen actividad endohidrolítica hidrolizan la cadena desde puntos internos de la cadena polimérica, dejando como resultado dos cadenas poliméricas con menos unidades (López, 2012).

La actividad catalítica de las enzimas depende de las condiciones de la reacción como son la temperatura, pH, concentración de sustrato, concentración de enzima, etc.

La temperatura afecta a las reacciones catalizadas por enzimas de manera similar que a las reacciones convencionales. Al aumentar la temperatura, la energía de las moléculas permite que la reacción se lleve a una mayor rapidez. La diferencia radica en que las enzimas a determinada temperatura pierden su conformación inactivándose, por lo que al llegar a una temperatura en la que la enzima pierde su configuración o se desnaturaliza, y la catálisis deja de llevarse a cabo. Debido a este fenómeno, el proceso; a diferentes condiciones de pH, concentración de sustrato, concentración de la enzima; tiene una temperatura recomendada de trabajo, en la que la reacción se lleva a cabo a la mayor velocidad posible sin que la enzima se desnaturalice (López, 2012).

Otra condición que afecta las reacciones catalíticas es el pH. Los aminoácidos de las enzimas tienen diferente carga o están protonados o no según el pH en el que se trabaje. El hecho de que un aminoácido clave para la reacción, se encuentre protonado o no puede afectar en la catálisis de la enzima sobre el sustrato no permitiendo que se lleve a cabo la reacción. Las enzimas también pierden estabilidad debido a pH extremo (o muy bajo o muy alto) y cuando la enzima pierde la conformación, pierde actividad catalítica. Por estas razones las enzimas también tienen un pH óptimo para la reacción (García et al. 2004).

La velocidad de reacción aumenta debido a la concentración de sustrato. Sin embargo, existe un límite para este aumento de reacción debido a que el número de sitios catalíticos de la enzima se satura y entonces al aumentar la concentración de sustrato ya no aumenta la velocidad de reacción.

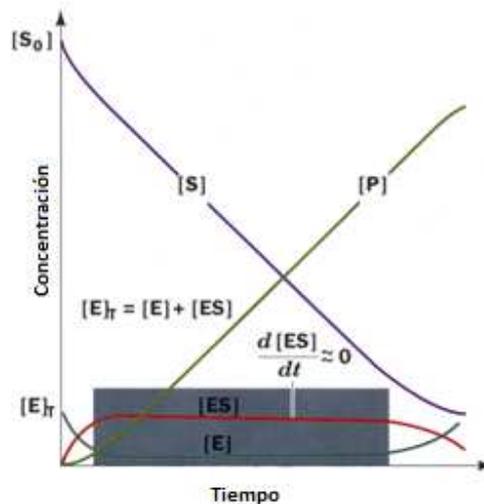


Figura 2. Concentración de enzima, sustrato, complejo enzima-sustrato y producto en el transcurso de una reacción enzimática. (Nelson et al. 2005).

Inulinasas.

Un proceso para llevar a cabo la hidrólisis de la inulina y producir IOS y/o fructosa es por la vía enzimática, estas rutas operan en condiciones suaves de reacción (pH y temperatura), a diferencia de los procesos químicos, producen poco o nada de desechos tóxicos y/o subproductos no deseables. Las enzimas que hidrolizan los enlaces β de la inulina a fructosa, glucosa e IOS se conocen como inulinasas y se clasifican dentro del grupo de las hidrolasas, EC 3.2.1.7 cuyo nombre sistemático es 1- β -D fructan fructohidrolasa, y su reacción es la endohidrólisis de los enlaces (2 \rightarrow 1)- β -D-fructosídicos en la inulina (IUBMB Enzyme Nomenclature, 1961). Éstas pueden dividirse en endo- y exo-inulinasas. Las endo-inulinasas hidrolizan los enlaces internos de la inulina para

producir principalmente inulotriosa, inulotetraosa, e inulopentaosa, mientras que las exo-inulinasas hidrolizan el extremo no reductor de la inulina (Chi et al. 2009). Las inulinasas se pueden obtener de plantas y microorganismos. Se han aislado y purificado de plantas como el diente de león, la achicoria y la alcachofa de Jerusalem.

Se ha reportado que entre los microorganismos que son capaces de producir altas concentraciones de inulinasas se encuentran hongos como *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, *Streptomyces* spp, bacterias como *Bacillus* spp, *Clostridium* spp, *Pseudomonas* spp, *Arthrobacter* spp, *Staphylococcus* spp, *Xanthomonas* spp, y levaduras como *Kluyveromyces* spp, *Cryptococcus* spp, *Pichia* spp, *Sporotrichum* spp y *Candida* spp (Gao et al. 2007). También se ha reportado que las levaduras producen una mayor concentración de inulinasas que los hongos y las bacterias. Entre las levaduras, *Candida pseudotropicalis* IP513 y dos cepas de *Kluyveromyces marxianus* tienen un alto potencial para la producción de estas enzimas (Ricca et al. 2007).

Actualmente las cepas microbianas que producen mayoritariamente endo-inulinasas son de especial interés ya que son capaces de producir IOS (Gern et al. 2001). Se han caracterizado endo-inulinasas provenientes de hongos incluyendo *Aspergillus niger* (Nakamura et al. 1994), *Penicillium purpureogenum* (Onodera et al. 1988) *Chrysosporium pannorum* (Xiao et al. 1989), y *Penicillium* sp. TN-88 (Nakamura et al. 1997).

Actualmente existen muy pocos reportes de microorganismos productores de inulinasas aislados del agave, *K. lactis* var. *lactis* aislada del pulque y reportada como *K. marxianus* (Estrada et al. 2001), *Kluyveromyces marxianus* A1 y A2 aisladas del aguamiel, y *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278 (Cruz-Guerrero et al. 1995).

Estos microorganismos se han aislado usando inulina de dalia como única fuente de carbono, lo que limita el aislamiento de cepas que pueden usar como fuente de carbono a las inulinas ramificadas.

Las inulinasas producidas por levaduras, hongos filamentosos y bacterias que pueden ser inducidas por el crecimiento de microorganismos, han sido muy estudiados en años recientes. Las especies más utilizadas son *Kluyveromyces fragillis*, *K. marxianus* (Hensing et al. 1995) y *Aspergillus niger* (Cazetta et al. 2010). Los hongos poseen la ventaja de producir las exo y endo inulinasas, además de que sus enzimas son extracelulares, por lo que los procesos de separación y purificación pueden ser más sencillos (Ricca et al. 2007).

Se han reportado múltiples formas de inulinasas (exo y endo) provenientes de hongos y las enzimas son típicamente diferentes ya que sus propiedades dependen del microorganismo productor. (Kaur et al. 2002) reportaron un peso molecular para la inulinasa de *Kluyveromyces fragillis* de 250 kDa, mientras que dentro del género *Aspergillus* se han reportado cuatro diferentes cepas productoras de inulinasas con pesos moleculares diversos: *A. niger* (300 kDa), *A. ficuum* (53 kDa), *A. candidus* (54 kDa) y *A. awamori* var. 2250 (69 kDa) (Ricca et al., 2007).

Únicamente existe una estructura de rayos X de una exo-inulinasa proveniente de *Aspergillus awamori*. Dicha exo-inulinasa es capaz de disgregar los enlaces β (2-1) y β (2-6) compuesta por 353 residuos de aminoácidos con dos dominios diferenciados. La catálisis que lleva a cabo esta enzima toma lugar por vía general de catálisis ácida con dos residuos catalíticos: un donador de protón y un nucleófilo (Glutamato y Aspartato) (Nagem et al. 2004) (Figura 3).

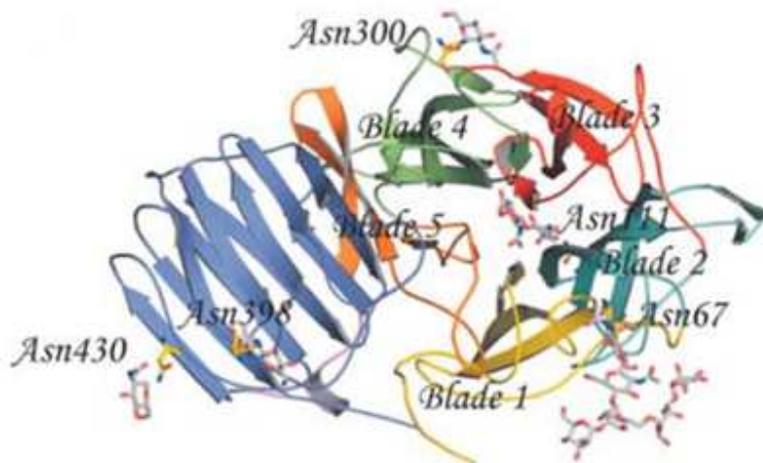


Figura 3. Representación de los elementos de estructura secundaria de la exoinulinasa.

Muchos trabajos en la literatura muestran los efectos de la temperatura y el pH sobre la actividad y estabilidad de las inulinasas. Es cierto que la respuesta de la enzima a estas variables depende principalmente de la cepa usada como fuente de la enzima. Pandey, en 1999 muestra que las inulinasas de hongos exhiben un pH óptimo para la hidrólisis entre 4.5 y 7.0, mientras que en el caso de las enzimas provenientes de levaduras y bacterias va de 4.4 a 6.5 y de 4.8 a 7.0 respectivamente. Las temperaturas óptimas son generalmente más altas para las bacterias y las levaduras que para los hongos. Sin embargo, la actividad de las enzimas se determina, en su mayoría, utilizando inulina de achicoria, dalia o alcachofa de Jerusalem como sustrato, que presentan estructuras lineales. Solamente existen un par de reportes en los que se emplea inulina de agave (agavina) y levana como sustrato de las inulinasas. Muñoz-Gutiérrez en el año de 2009 utiliza una preparación enzimática comercial obtenida de *A. niger*, Fructozyme L de Novozyme, que contiene actividad endo y exoinulinasa, y la exoinulinasa de *T. marítima* para la producción de fructosa, utilizando inulina de achicoria e inulina de agave. Los resultados mostraron que la enzima tiene

preferencia por la inulina de achicoria. Por su parte Arrizon en el año de 2011 demuestra que la fructanasa de *Kluyveromyces marxianus*, aislada del proceso de fermentación del mezcal presenta mayor actividad enzimática y especificidad sobre hidrólisis de los fructanos de agave que la enzima comercial Fructozyme L.

Los Inulooligosacáridos producidos por una acción enzimática de microorganismos han demostrado proporcionar una variedad de beneficios para la salud en los seres humanos y animales debido a sus características funcionales, propiedades tales como bajo valor calórico, la utilización selectiva por las bacterias intestinales, la reducción de colesterol y el alivio de la constipación (Kaur et al. 2002).

Un proceso para la producción de inulooligosacáridos con diferentes grados de polimerización (GFN y Fn) exclusivamente implica la hidrólisis de inulina por endo-inulinasas. Sin embargo, la mayoría de los informes de la literatura describe una mezcla de exo y endo-inulinasas producida por cepas de hongos, principalmente del género *Aspergillus* (López, 2012).

La aplicación de diseños factoriales ha dado buenos resultados para la optimización de procesos fermentativos y son cada vez más usados, particularmente en la producción de inulinasas porque permiten estudiar varios factores al mismo tiempo y sus posibles interacciones (Corona et al. 2005).

Modelo de Monod.

Si en un cultivo uno de los requerimientos esenciales para el crecimiento (sustrato y nutrientes), estuviera presente sólo en cantidades limitadas, se agotaría primero y el crecimiento cesaría. El modelo matemático de Monod (1942, 1949) asume que la rapidez de asimilación del sustrato, y

en consecuencia la rapidez de producción de biomasa, está limitada por la rapidez de reacción de las enzimas involucradas en el compuesto alimenticio que está en menor cantidad con respecto a sus necesidades.

De esta manera, Monod desarrolla una ecuación muy simple para representar los procesos biológicos que funciona en general muy bien. Para ello asumió que si bien pueden existir muchos sustratos, uno de ellos será el limitante. En este modelo se asume que la producción de biomasa depende exclusivamente de la concentración de este sustrato limitante. Para una reacción biológica del tipo Sustrato→[Biomasa], la velocidad de crecimiento de biomasa puede representarse como sigue:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_S}$$

Dónde:

μ_{max} = es la velocidad específica de crecimiento máxima, h^{-1}

K_S = es la constante de saturación, g/l.

S = es la concentración de sustrato limitante, g/l. (Fabiell, n. d.).

Esta ecuación es semi-empírica y en efecto se deriva de suponer que una única enzima con una cinética del tipo Michaelis-Menten es la responsable del consumo de S y conjuntamente que la cantidad de enzima o bien su actividad catalítica es lo suficientemente baja como para controlar el crecimiento.

Dado que las enzimas son suministradas por la masa microbiana, se dice que el sistema es esencialmente limitado en biomasa, y la ecuación es una ecuación de primer orden en la biomasa; esto es, la rapidez de crecimiento es proporcional a la primera potencia de la biomasa presente. Cuando el sistema es limitado en sustrato, y en este caso la rapidez de crecimiento es constante y la constante de rapidez de crecimiento es de orden cero en la biomasa; esto es, la constante de

rapidez del crecimiento es independiente de la biomasa presente. Cuando $S = K_s$, la constante de rapidez del crecimiento es la mitad del máximo.

Si todo el sustrato fuera convertido en biomasa, entonces la rapidez de consumo de sustrato sería igual a la rapidez de producción de biomasa. Sin embargo, debido a que el catabolismo convierte parte del sustrato en productos de desecho, la rapidez de consumo de sustrato será mayor que la rapidez de producción de biomasa.

Las tasas de rapidez de producción de biomasa y consumo del sustrato pueden ser afectadas por muchos factores externos, entre los que puede mencionarse la temperatura, pH y tóxicos. Las constantes de rapidez aumentan cuando la temperatura se eleva en el intervalo de 0 a 55° C, con el correspondiente incremento en la producción de biomasa y consumo de sustrato. Los incrementos en las tasas de reacción siguen aproximadamente la regla de Vant Hoff-Arrhenius de duplicación por cada 10° C de incremento en temperatura por encima de la temperatura máxima. El calor excesivo desnaturaliza las enzimas y puede destruir al organismo (Fabiell, n. d.).

Identificación del microorganismo por ITS-PCR.

El ribosoma es una estructura de RNA que se encuentra en las células y su función es llevar a cabo la síntesis de proteínas, ese RNA es obtenido porque se transcribe una región de DNA, dicho de otra manera, a partir del DNA, se transcribe la región correspondiente y se obtiene un RNA, el cual corresponde a varias subunidades del ribosoma.

La región ITS (Internal Transcribed Spacer), se refiere a una pieza de ARN no funcional situada entre los ARN ribosómicos estructurales (ARNr) en una transcripción precursora común.

Sin embargo, esas subunidades que se obtienen al cortar el RNA durante su maduración, no están ligadas inmediatamente una de la otra, están unidas por regiones espaciadoras llamadas ITS, por lo cual la fracción completa es identificada como 18S, ITS1, 5.8S, ITS2 y 28S (Higgins, 2012).

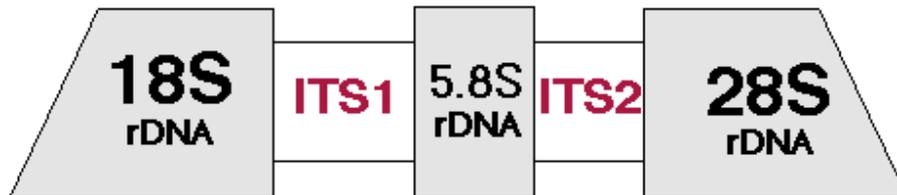


Figura 4. Fracción de subunidades e ITS del RNA (Higgins, 2012).

El ribosoma es una superestructura funcional que evolutivamente, se conserva; si se conserva su estructura, se conserva el DNA que le dió origen o no hay un cambio importante en su secuencia.

Por otro lado, durante el periodo de maduración del RNA, existe una pérdida significativa de las regiones espaciadoras por no tener otra función más que espaciar, así que cuando un organismo diverge, se obtienen especies que conservan sólo su secuencia de DNA; por lo cual, al leer la región ITS se puede saber si dos organismos son de la misma especie, entre más alejadas las especies, menos igualdad existirá.

La comparación de secuencias de la región ITS es ampliamente utilizado en la taxonomía y la filogenia molecular porque a) debido al alto número de copias de los genes de RNA ribosomal, es fácil de amplificar incluso si se tienen pequeñas cantidades de ADN, y b) tiene un alto grado de variación incluso entre especies estrechamente relacionadas. Esto se debe a la relativamente baja presión evolutiva que actúa en estas secuencias no funcionales (Higgins, 2012).

Las técnicas moleculares que existen actualmente para identificar levaduras fueron desarrolladas como una alternativa a las pruebas morfo-fisiológicas tradicionales y para obtener una rápida identificación. Las 4 técnicas más utilizadas actualmente son: secuenciación de las regiones ribosomales, siendo la región D1/D2 del gen 26S la más utilizada, el estudio del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) de las regiones ribosomales, principalmente las regiones ITS-5.8S, electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (PCR-DGGE) empleando iniciadores universales y PCR en tiempo real. La técnica de RFLP de las regiones ITS-5.8S se desarrolló como una alternativa de identificación de levaduras de manera rápida para su utilización en la industria. Esta técnica ha sido utilizada por diferentes autores para identificar levaduras aisladas de diferentes fuentes como mostos de vinos, cidra, jugo de naranja, miel, cerveza de sorgo, masa, productos lácteos y recientemente en muestras clínicas para la identificación de levaduras y hongos patógenos (Segura et al. 2010).

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (siglas de su nombre en inglés Polymerase Chain Reaction) permite generar una gran cantidad de copias de un fragmento de DNA (ácido desoxirribonucleico). El requisito fundamental para poder llevar a cabo la reacción es disponer de fragmentos cortos de DNA de cadena sencilla complementarios a los extremos del fragmento a amplificar. Estos fragmentos servirán como cebadores para que una enzima polimerasa sea capaz de incorporar nucleótidos complementarios a la cadena molde. Una vez completada la reacción la cantidad fragmento amplificado se puede visualizar mediante técnicas sencillas de separación de fragmentos de DNA.

Tras la extracción del DNA a partir de un tejido se obtiene el DNA total contenido en el conjunto de células del tejido utilizado. Este DNA se

puede observar como un precipitado, que es posible re-suspender en agua o en un tampón apropiado. Si se separa mediante electroforesis en gel de agarosa se observa como una única banda de elevado peso molecular.

La enzima capaz de generar una copia de DNA a partir del DNA molde, es conocida como una DNA polimerasa. La reacción se lleva a cabo en un tampón apropiado para el funcionamiento de la enzima polimerasa. Además, como cofactores de la polimerasa se añaden cationes divalentes, generalmente en forma de cloruro de magnesio ($MgCl_2$) (Pérez et al. 1995).

Componentes de la PCR.

Iniciadores de la reacción: Las enzimas DNA polimerasas únicamente son capaces de añadir nucleótidos al extremo 3' libre de una doble cadena de DNA. Son necesarios por tanto moléculas cortas (entre 10 y 30 bases) de DNA de cadena sencilla. Estas moléculas son los cebadores o primers de la reacción, los cuales delimitan el fragmento a amplificar.

Nucleótidos libres: las enzimas DNA polimerasas van a crear una cadena complementaria a la cadena molde mediante la incorporación de nucleótidos al extremo 3' libre del cebador que se ha unido a la cadena molde. Los nucleótidos se añaden en forma de desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs). Estos cuatro componentes son los elementos básicos que es necesario incorporar a la reacción para que se complete una PCR.

El proceso que tiene lugar durante la PCR se puede resumir de la siguiente forma: partiendo de un DNA molde, una enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a partir de la zona de doble cadena originada por la unión de los cebadores al molde. Los cambios

de temperatura constituyen la base para que se completen los pasos necesarios (Pérez et al. 1995).

El proceso se lleva a cabo en tres fases:

- En primer lugar es necesario que el DNA se desnaturalice, es decir, que las dos cadenas de DNA se separen. Esta primera fase se conoce como desnaturalización y se lleva a cabo elevando la temperatura a alrededor de 94°C.
- El siguiente paso consiste en un descenso de la temperatura para permitir que los cebadores se unan por complementariedad al DNA molde. Esta segunda fase se conoce como hibridación. Temperaturas habituales en esta fase oscilan entre 35 y 60°C.
- Por último, en la fase de elongación o extensión, la enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a partir del extremo 3' libre de la región en que han hibridado los cebadores.

Estas tres fases constituyen un ciclo de la PCR. Por un ciclo de PCR únicamente se obtiene una copia de un pequeño fragmento del DNA molde.

La especificidad de la PCR depende, fundamentalmente, de la temperatura empleada en la fase de hibridación y de la cantidad de iones divalentes que se incorporan a la reacción (además de depender de la secuencia de los cebadores). Por una parte, cuanto mayor sea la temperatura utilizada en la fase de hibridación, más específica es la reacción. Por otra parte, en un determinado rango, incrementos en la concentración de $MgCl_2$ hacen disminuir la especificidad de la reacción; los iones facilitan la unión del cebador a la cadena molde y permiten la incorporación de los nucleótidos a la cadena creciente.

Por cada ciclo que se completa se duplica la cantidad de fragmento a amplificar. Es decir, que al final del proceso se obtiene aproximadamente una cantidad de fragmento igual al producto de la cantidad inicial de DNA molde por 2^n , siendo n el número de ciclos (Pérez et al. 1995).

Justificación.

La inulina de agave, a diferencia de la proveniente de otras especies como la achicoria, es un biopolímero altamente ramificado con estructura que combina residuos de fructosa unidos además de la presencia de residuos de glucosa dentro y fuera de la cadena.

El estudio de las funcionalidades de estos compuestos es realizado en respuesta a la demanda creciente de consumidores de alimentos sanos y bajos en calorías. Se ha reportado que los IOS aumentan la población de bifidobacterias en el intestino y se ha propuesto que el predominio de estas bacterias en el intestino grueso tiene un gran potencial para contribuir en la prevención de muchas enfermedades y mantener la salud en general. Estos compuestos también ayudan en la síntesis de vitaminas B y en la absorción de ciertos iones como calcio y magnesio. Cabe resaltar que las inulinasas tienen un enorme potencial en la industria alimentaria. Es importante también mencionar que los IOS son tres veces mas dulces que la sacarosa, no son cariogénicos ni usados como fuente de energía para el organismo, por lo que la información generada en este trabajo será de enorme interés para futuros proyectos como lo pueden ser productos de consumo para diabéticos o personas en regimenes alimenticios controlados por mencionar algunos.

En el presente trabajo se busca obtener una alternativa para la producción de IOS que consista en el aprovechamiento integral de las plantas de agave, particularmente los residuos de la producción del tequila como son las hojas por medio del estudio de las condiciones de crecimiento de un microorganismo así como su producción de inulinasas para finalmente ser caracterizado para identificar el género y la especie del mismo.

Hipótesis.

A partir del aislamiento de microorganismos presentes en agave ya sea en hojas o residuos, se podrán obtener enzimas capaces de hidrolizar inulina de agave.

Objetivo General.

- Identificación y caracterización de un microorganismo capaz de hidrolizar la inulina de agave, así como la determinación de las mejores condiciones de producción de inulinasas.

Objetivos particulares.

- Identificar y caracterizar microorganismos capaces de utilizar la inulina de agave como única fuente de carbono.
- Determinar las condiciones óptimas para el crecimiento del microorganismo seleccionado y su producción de inulinasas.

Metodología.

Metodología 1ra parte.



Figura 5. Diagrama de bloques de metodología. Primera parte.

Metodología 2ª parte.

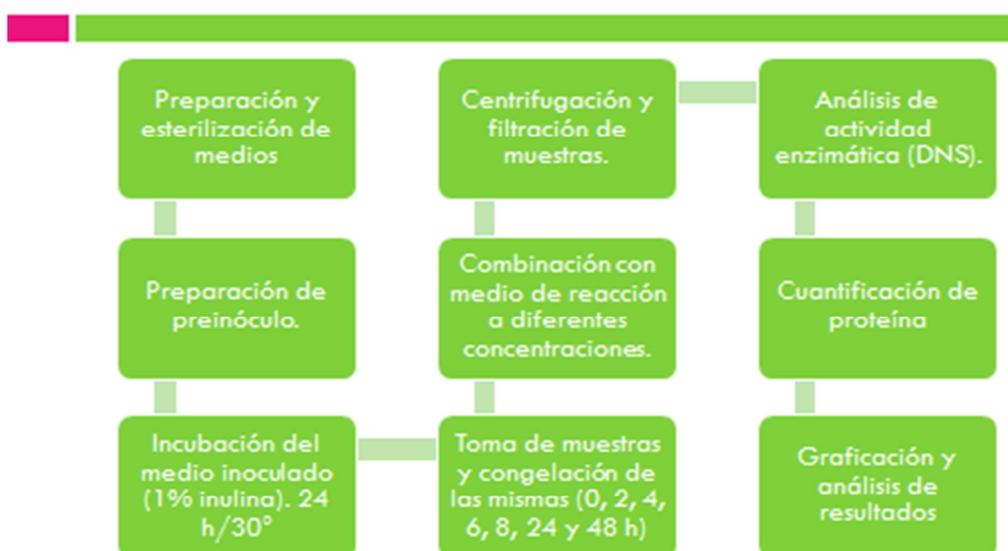


Figura 6. Diagrama de bloques de metodología. Segunda parte.

Materiales y metodología.

Preparación y esterilización de medios.

Se utilizaron dos medios para la selección de cepas con la siguiente composición, teniendo como única variante la concentración de inulina de agave presente.

- 0.1% m/v $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 0.1% m/v KH_2PO_4
- 0.2% m/v Extracto de levadura.
- 0.05% m/v KCl.
- Inulina de agave Aga Fit, a una concentración variante en el medio de 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0% m/v.

La esterilización de los medios, se llevó a cabo en autoclave, a 121 °C (una atmósfera de sobrepresión) con un tiempo de exposición de 15 minutos.

Selección de cepas y preparación de preinóculo.

La cepa en estudio fue seleccionada de entre 8 previamente aisladas del bagazo de agave de tequila en estudio en el proyecto "Babethanol", con base a su crecimiento con inulina de agave en el medio como única fuente de carbono. Estas cepas fueron aisladas e inoculadas en un medio de cultivo previamente descrito más 50% de glicerol como crioprotector para su conservación en congelación a -80°C. Las cepas fueron descongeladas y bajo condiciones de asepsia, se inocularon con una asada en tubos con tapón de rosca, con el fin de preparar un preinóculo que se incubó a 35.0°C con agitación durante 24 h para la inoculación posterior de los medios preparados por triplicado con las distintas concentraciones de inulina de agave previamente descritas.

Se comparó la densidad óptica entre los medios con inulina y se determinó el mejor crecimiento de microorganismos.

Inoculación e incubación de medios.

Se inocularon los medios con 700 μ l de preinóculo con una concentración en peso seco de entre 17 y 19 mg/ml y se incubaron durante 72 h a 35.0°C con agitación a 200 rpm.

Toma de muestras y análisis de crecimiento.

Se tomaron muestras de 3 ml a los tiempos de 0, 2, 4, 6, 24, 36, 48, 54 y 72 h y se midió densidad óptica en espectrofotómetro Perkin Elmer 2 lamda a 600 nm.

Por otro lado, se colocaron 1.5 ml de muestra en microtubos previamente pesados, se centrifugaron durante 10 min a 14000 rpm, se separó el sobrenadante del pellet y este último se secó a 40°C hasta peso constante.

Estos resultados se graficaron para el análisis del crecimiento correspondientes a las distintas concentraciones de inulina de agave.

Determinación de azúcares reductores por la técnica de Miller.

Se determinó la concentración de azúcares reductores generados durante el crecimiento del microorganismo con el sobrenadante obtenido en la centrifugación de las muestras para la determinación de peso seco por la técnica de Miller o DNS (Anexo 1).

Cromatografía de líquidos en capa fina.

Para observar de una manera general y cualitativa los productos de la reacción se realizó cromatografía de capa fina (Anexo 2).

Determinación de proteína.

Se realizó la cuantificación de proteína contenida en el medio, durante el crecimiento del microorganismo a diferentes tiempos por el método de Bradford (Anexo 3), tomando muestras de 3 ml a los tiempos de 3, 5, 7, 8, 24, 26, 28, 30, 32 y 48 h, calculando la concentración de proteína en la muestra a partir de una curva patrón con albúmina bovina sérica de SIGMA con una solución stock con concentración única de 0.1 mg/ml.

Identificación genética de la cepa IS03 (ITS).

Para conocer el género y especie de la cepa seleccionada se amplificó la región ITS, para lo cual se extrajo el DNA genómico con solución DNAzol (Gibco-BRL). Los tubos con 5 mL de cultivo, se centrifugaron por 5 min a 12000 rpm, posteriormente se calentaron a 80° C por 10 minutos y se enfriaron con nitrógeno líquido. Se agregó 1 mL de DNAzol y se homogenizaron agitando los tubos por inmersión aproximadamente 10 veces. (La agitación fue lentamente, debido a que el DNA se podía romper). Los tubos se centrifugaron 10 min a 10,000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante (aprox. 0.9 mL) se pasó a un tubo limpio usando una pipeta de 1 mL.

Se agregaron 0.5 mL de isopropanol (-20° C) y se mezcló por inversión. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos. Después se centrifugó 10 min a 10,000 rpm a 4°C y se eliminó el sobrenadante por decantación. Se realizó un lavado con 1 mL de etanol (70%) y se centrifugó (2 min/10,000 rpm/4°C) el sobrenadante se eliminó por decantación. Se dejó secar el precipitado con el tubo abierto durante aproximadamente 15 minutos, finalmente se añadieron 20 µL de agua estéril. Se cuantificó la cantidad de DNA usando un equipo nanodrop, cuyo principio es igual al de un espectrofotómetro, pero sólo emplea 1 µL de muestra. Este equipo se basa en el principio de absorción de luz del DNA a 240 nm. Una vez cuantificado el DNA,

regularmente se purificaron alrededor de 700 ng/ μ L, se amplificó la región ITS por medio de la reacción de PCR.

Los cebadores empleados para la amplificación fueron:

ITS4 **5`-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3`**

ITS5 **5`-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3`**

Las condiciones de la reacción de amplificación fueron las siguientes:

- 1-. Desnaturalización: 3,40 minutos a 94°C.
- 3-. Alineación: 40 segundos a 56°C.
- 4-. Extensión: 40 segundos a 72°C.
- 5-. Elongación final: 7 minutos a 72°C.

Tabla 2. *Reactivos y cantidades utilizadas para la reacción PCR.*

Reactivo	Cantidad
Buffer 5x	1x
dNTP's 10 mM	0.2 mM
Oligo Forward 20 μ M	0.4 μ M
Oligo Reverse 20 μ M	0.4 μ M
DNA	100 ng
Taq polimerasa	1 μ L
Agua	c.b.p 20 μ L

Obteniendo de esta manera un volúmen total de la reacción de 20 μ L.

Posteriormente se realizó la purificación del DNA por medio de la lisis celular no enzimática a 65° C, seguido de la eliminación de la proteína por precipitación, la precipitación del DNA y finalmente su resuspensión.

Una vez purificado, se realizó electroforesis a mayor volumen, 80µL, partiendo de un gel de agarosa, para su posterior secuenciación.

La secuenciación se llevó a cabo en la empresa Laragen Virginia Ave. Culver City, CA 90232. Los datos de secuenciación obtenidos se introdujeron a una base de datos (BLAST NCBI) para su alineamiento y comparación.

Resultados y discusión.

Selección de Microorganismos Consumidores de Inulina de Agave.

De la colección de cepas aisladas del bagazo de agave, ocho de ellas se seleccionaron por su capacidad de emplear inulina de agave como única fuente de carbono y las cuales fueron la base para llevar a cabo el presente trabajo, codificadas como IS02, IP204, SS5, IP03, IP206, IS03, IP04, ISS10, mismas que fueron conservadas en el medio de cultivo previamente descrito más 50% de glicerol y congeladas a -80°C.

Las ocho cepas se inocularon con tres asadas y se incubaron durante 48 h a 35° C y 150 rpm en dos medios líquidos previamente descritos, uno sin inulina y el otro con inulina de agave en una concentración del 0.5% (m/v) con la finalidad de determinar si la inulina es la principal fuente de carbono en el medio. Al finalizar las 48 h de incubación se tomaron muestras de 3 ml para medir su absorbancia a 600 nm. Esto nos permitió determinar la concentración de biomasa, resultados que se muestran en la figura 7.

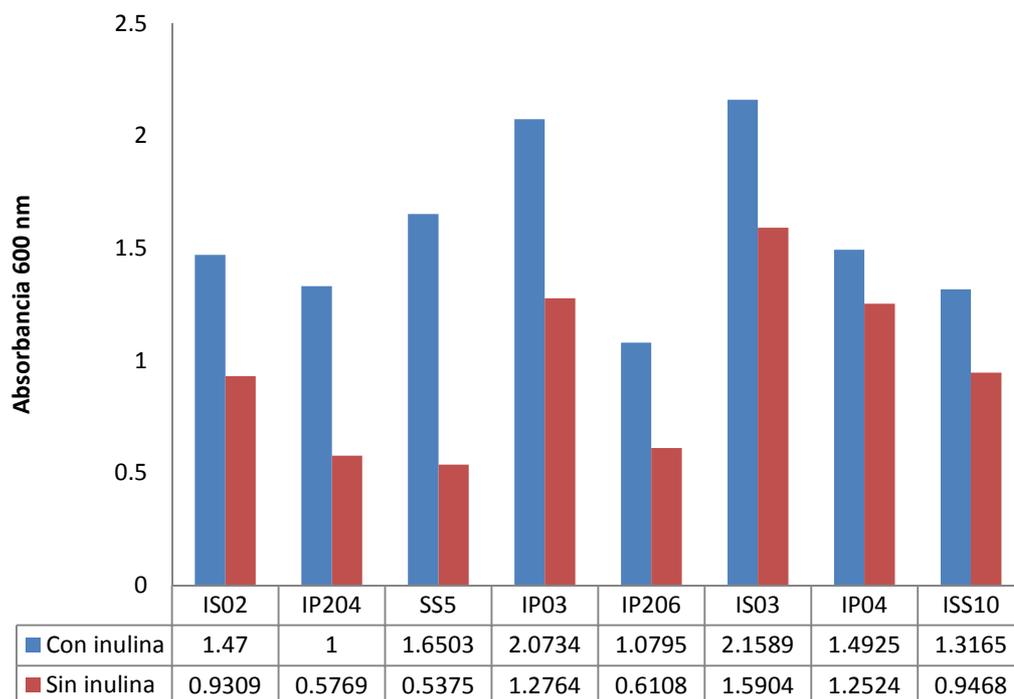


Figura 7. Absorbancia de la biomasa de las ocho cepas en estudio, en los medios con y sin inulina a 35° C.

Con esta figura (figura 7) se observó que las cepas con mayor crecimiento en presencia de inulina de agave fueron la IP03 y la ISO3, siendo estas las seleccionadas para la determinación de las mejores condiciones de crecimiento y su actividad enzimática sobre el sustrato en estudio. Los resultados mostraron que sin inulina de agave en el medio también hubo crecimiento pero en un porcentaje menor que al presentado en el medio con inulina, entre el 30 y el 50%.

Evaluación del crecimiento microbiano por densidad óptica y peso seco.

Se tomaron 3 ml de muestra a cada tiempo para leer su absorbancia a 600 nm, en algunos casos se hicieron diluciones por la alta concentración de células en la muestra (muestras tomadas después de las 24 h de incubación), las cuales fueron de 1:10 en las muestras

tomadas a las 4, 6 y 24 h, de 1:25 a las 32 h y de 1:50 para las 48, 56 y 72 h. Se observó que la cepa IS03 bajo las mismas condiciones crece mejor que la cepa IP03 (Figura 8).

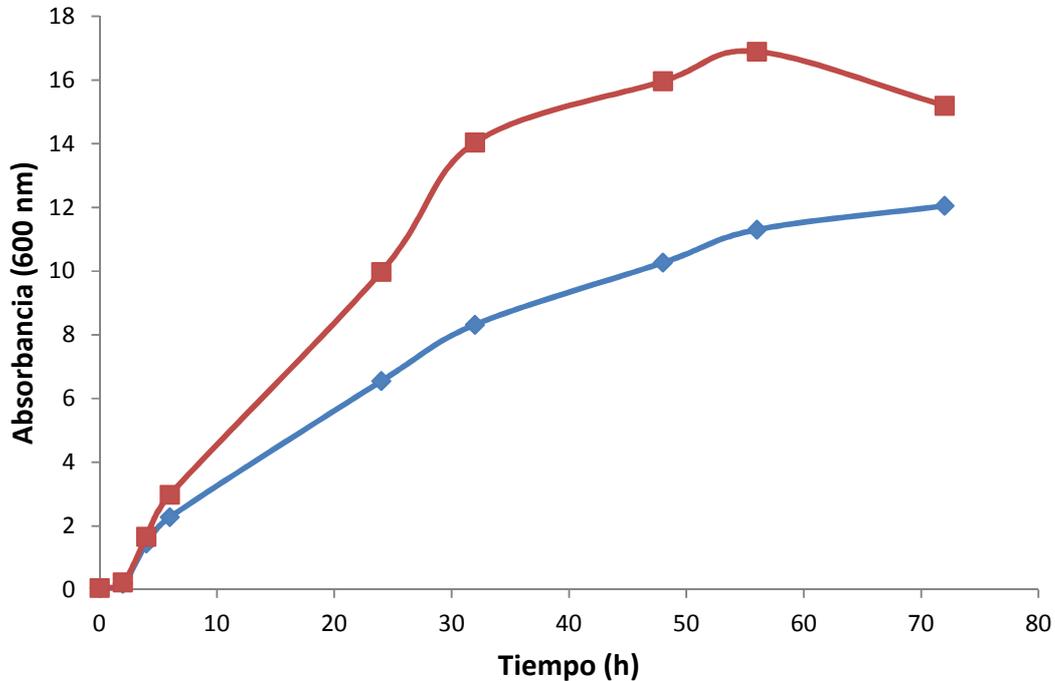


Figura 8. Crecimiento de las cepas IP03  e IS03  medido por densidad óptica en el medio de crecimiento con inulina al 0.5% m/v a 35° C.

Una manera alterna de evaluar el crecimiento de los microorganismos fue mediante el peso seco de las muestras tomadas en el mismo intervalo de tiempo, para esto se tomaron 1.5 ml de muestra y se colocaron en microtubos previamente pesados, se centrifugaron durante 10 min a 14000 revoluciones por minuto, posteriormente se decantó el sobrenadante y la muestra se secó a 50°C durante 24 h, tiempo en el que se obtuvo un peso constante de las mismas. Los resultados volvieron a mostrar, al igual que en la figura 8, que el crecimiento de la cepa IS03 es superior al correspondiente a la IP03 (Figura 9).

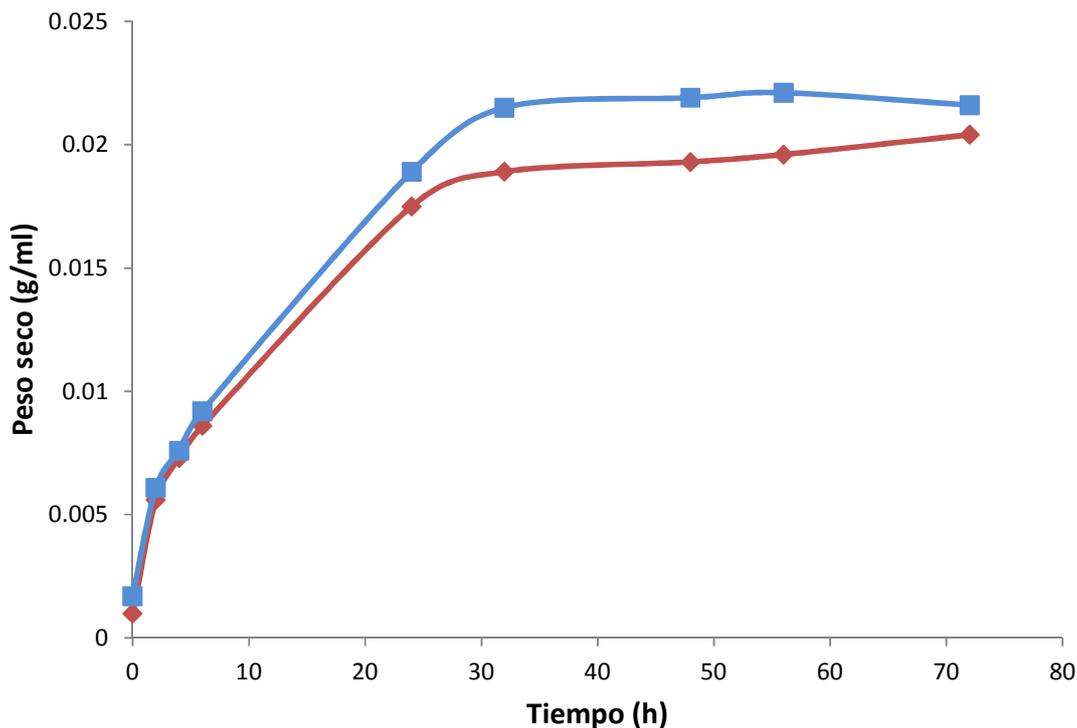


Figura 9. Crecimiento de las cepas IS03 ■ e IP03 ◆ medido por peso seco (g/ml) en un medio de crecimiento con 0.5% m/v de inulina a 35° C.

Determinación de consumo de inulina de agave en el medio.

Los microorganismos seleccionados son capaces de crecer en ausencia de inulina usando el carbono presente en el extracto de levadura del medio, y en presencia de inulina quizá el crecimiento pudiera deberse a que los microorganismos emplean las impurezas de la inulina de agave (oligosacáridos y fructosa), por lo cual, para evaluar si efectivamente la inulina de agave era consumida por los microorganismos, se determinó la concentración de inulina residual de manera indirecta, a través de la concentración de azúcares reductores remanente en el medio de cultivo durante 72 h. A partir de las 24 h se observó que la inulina de agave había sido consumida casi en su totalidad por la cepa IS03, mientras que la cepa IP03 a este tiempo había consumido el 80% de la inulina inicial (Figura 10). Es importante notar que la velocidad de consumo de

inulina es de 1.1 mg/ml h para ambos microorganismos, la única diferencia es que la cepa IS03 consume la totalidad de inulina en un periodo de tiempo de 24 h y la IP03 lo hace hasta después de las 72 h. Estos resultados, comparados con los mostrados en la figura 8 y 9, indican una relación por la liberación de azúcares reductores del sustrato, lo cual es atribuible a la degradación de la inulina por parte de los microorganismos.

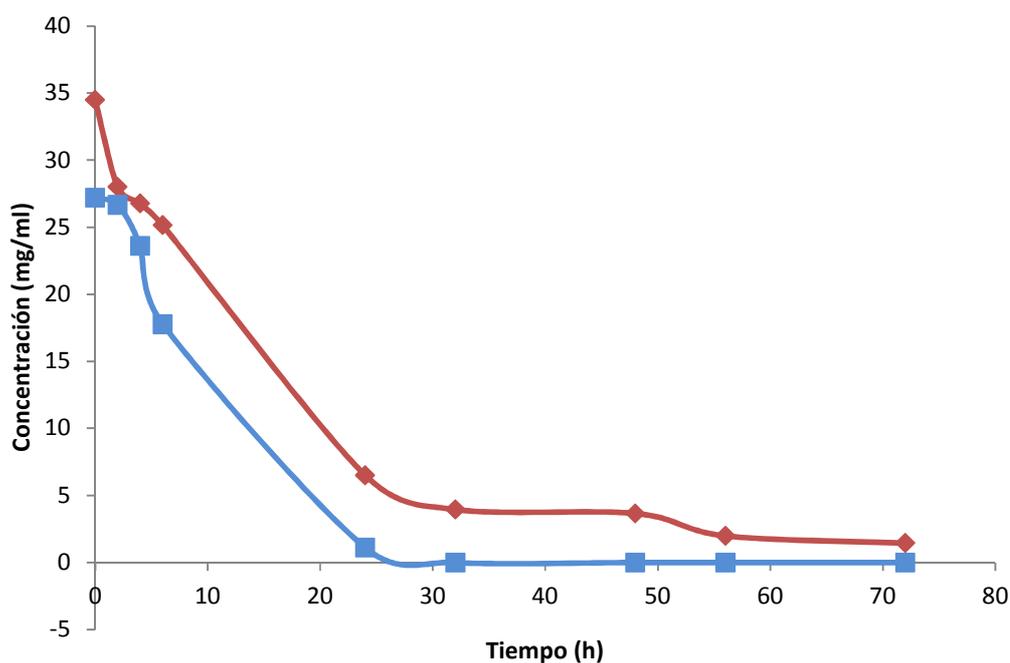


Figura 10. Concentración de inulina de agave en el medio con respecto al tiempo de crecimiento de las cepas IS03 ■ e IP03 ◆.

Estos resultados nos sugieren que dado que los microorganismos consumen en su totalidad la inulina como su fuente de carbono, la expresión de las inulinasas se está llevando a cabo.

Una manera de ver la evolución del consumo de inulina y la presencia de posibles productos de la hidrólisis que pudiera llevarse a cabo, es la evaluación cualitativa por medio de cromatografía en capa de fina (TLC) con los sobrenadantes obtenidos después de la centrifugación de las muestras.

En la TLC control (figura 11a), se observan las señales correspondientes a la inulina de agave, sacarosa, fructosa y glucosa como muestras control.

Por otro lado, las TLC de las muestras para ambos microorganismos se compararon con lo analizado en la determinación de azúcares reductores, observando que en las primeras cromatoplasmas reveladas (figuras 11b y 11c), tenemos bandas correspondientes a la presencia de la inulina en el medio y la fructosa y/o glucosa, mismas señales que se atenúan después de las 24 h de crecimiento, lo cual, concuerda en las figuras 8 y 9, donde a este mismo tiempo de crecimiento del microorganismo, hay un consumo total de inulina, lo cual nos deja el medio con monómeros como única fuente de carbono, mismos que son consumidos a partir de este tiempo, llamado en algunos estudios como un ejemplo de un producto asociado al crecimiento (Castillo et al., 2010).

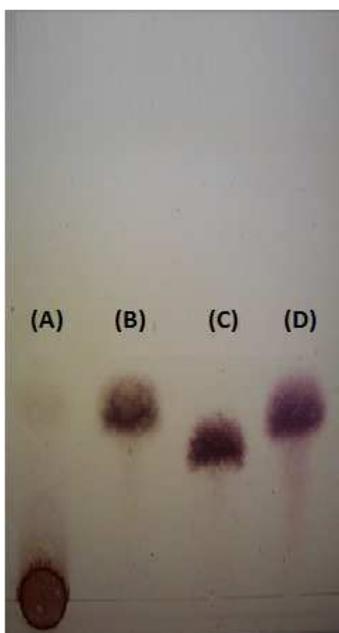


Figura 11a. TLC control, muestras de (A) Inulina de agave, (B) Fructosa, (C) Sacarosa y (D) Glucosa una concentración de 0.01 mg/ml.

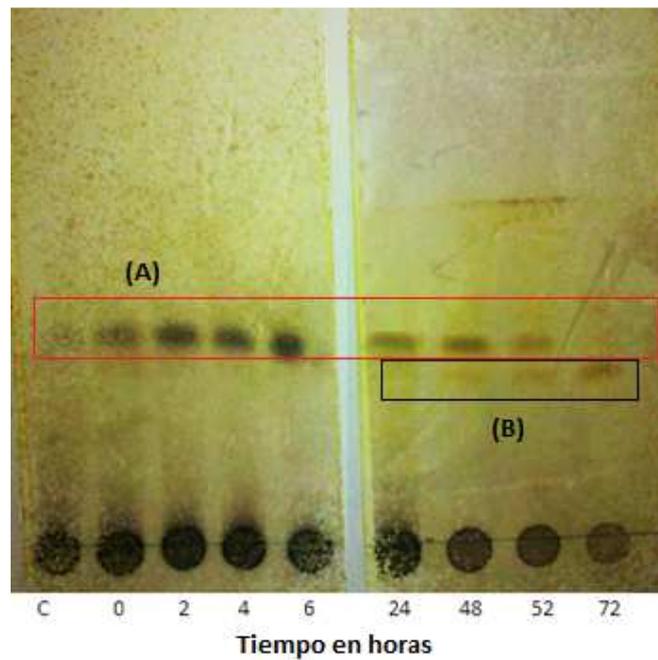


Figura 11b. TLC del sobrenadante a diferentes tiempos (horas) del microorganismo IS03, (A) Señales correspondientes a la presencia de monómeros, fructosa y/o glucosa, (B) Señales correspondientes a la presencia de oligosacáridos. (C: Control de inulina de agave a una concentración de 0.01 mg/ml).

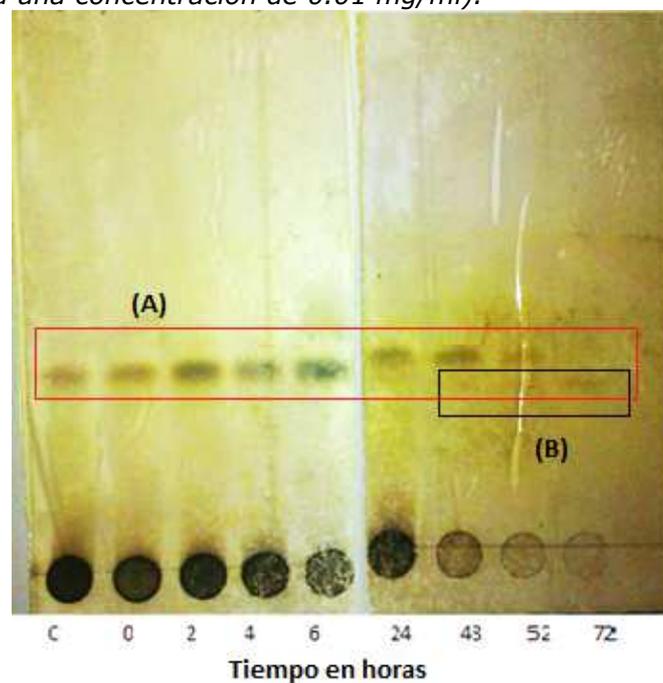


Figura 11c. TLC del sobrenadante a diferentes tiempos (horas) del microorganismo IS03, (A) Señales correspondientes a la presencia de monómeros, fructosa y/o glucosa, (B) Señales correspondientes a la presencia de oligosacáridos. (C: Control de inulina de agave a una concentración de 0.01 mg/ml).

Recopilando todos los datos obtenidos en experimentos pasados referentes a los microorganismos IS03 e IP03 en la figura 12, se hizo una comparación entre las dos cepas, mismos que nos permitieron elegir uno de los microorganismos para un estudio más profundo y de una manera más certera.

Una vez más, se observó que la cepa IS03 presentó una biomasa mayor que la IP03, al igual que un consumo de inulina en periodos de tiempo más cortos, lo cual nos sugiere una producción de enzimas mayor y más eficiente, mismos resultados que en efecto, nos llevaron a la selección final del microorganismo, siendo este el IS03.

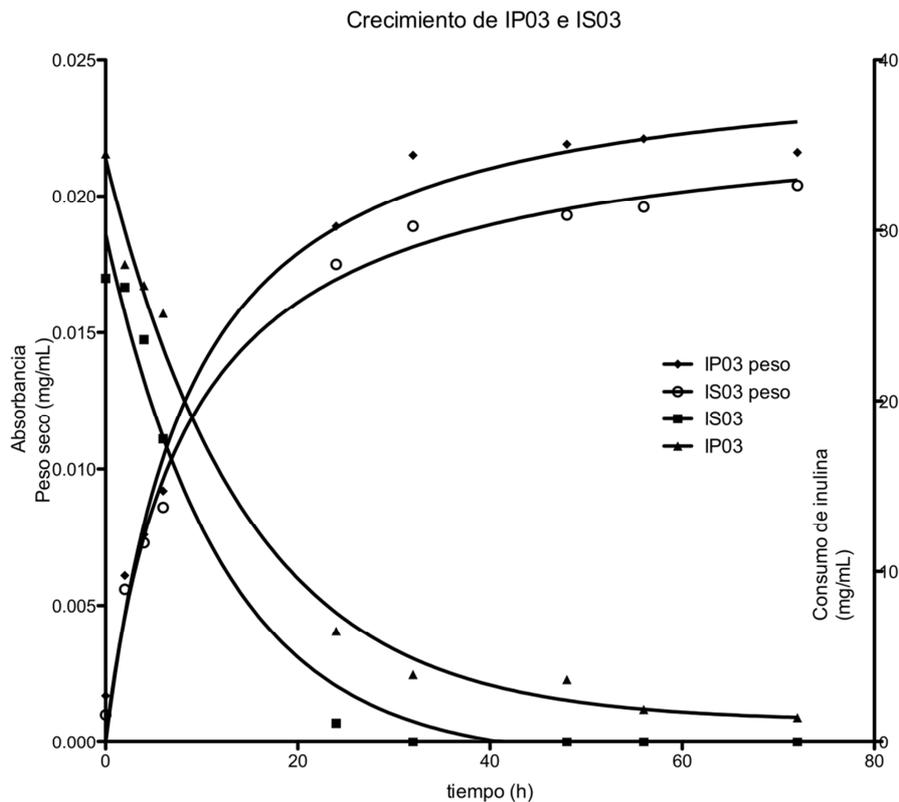


Figura 12. Comparación de crecimiento y consumo de inulina de las cepas IS03 e IP03.

Efecto de la concentración de inulina de agave en el crecimiento de IS03.

Una vez seleccionado el microorganismo, se determinó el efecto de la concentración de inulina de agave en el medio de cultivo.

La cepa IS03 fue inoculada por asada en 10 ml de medio con una concentración de inulina de agave al 0.5% para ser utilizado como preinóculo, se mantuvo en incubación durante 24 h con agitación de 150 rpm, posteriormente se inocularon 700 µl del mismo a los medios en estudio con diferentes concentraciones de inulina de agave como única fuente de carbono, siendo estas 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0%, estas pruebas se prepararon en un volumen de 50 ml colocados en matraces Erlenmeyer con tapón de rosca y se repitió el mismo procedimiento de toma de muestras que en la primera parte de la experimentación.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 13. Se observó un mejor crecimiento del microorganismo en los medios con las concentraciones de inulina de agave de 2.5% y 3.0%, a menor concentración de sustrato hay una insuficiencia del mismo en el medio y a mayores concentraciones el exceso de la misma provoca una limitación en el crecimiento, debido a que la capacidad de consumo del microorganismo se también se limita. A partir del punto de saturación la reacción no puede acelerarse mediante adición de sustrato, sea cual sea la cantidad añadida.

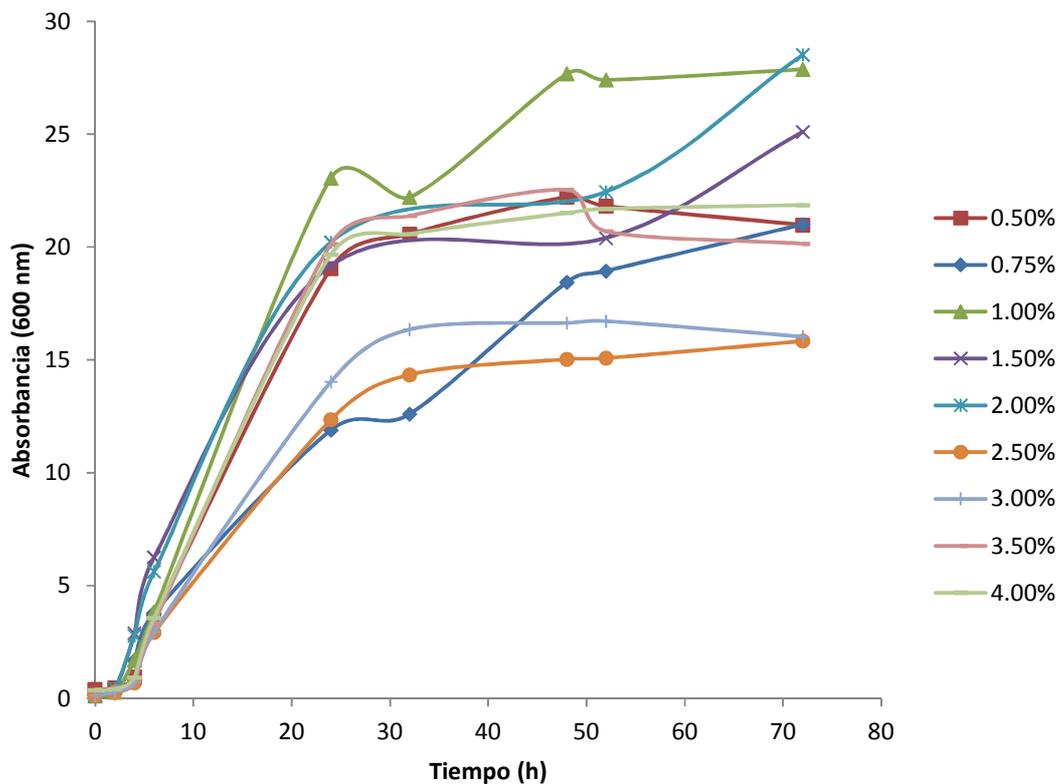


Figura 13. Efecto de las diferentes concentraciones en porcentaje de inulina de agave en el crecimiento de IS03.

Con estos resultados se calculó el crecimiento del microorganismo en cuestión en función de la concentración del sustrato (Figura 13). El exceso de sustrato en el medio nos da lugar a una saturación en el sitio activo de la enzima, se analiza una curva en la que se reconoce al inicio un complejo enzima-sustrato sin haberse unido y va dándose la unión del sustrato con el centro activo a medida que avanzamos en la curva, de manera que llegamos a una saturación de las enzimas por el sustrato. Esta saturación se debe a que encontramos más cantidad de sustrato que de enzimas y estas no tienen la capacidad de catalizar todo el sustrato presente al mismo tiempo.

Este ensayo se realizó a dos temperaturas, 30° y 35° C, con los resultados obtenidos en la figura 13, se obtuvieron las pendientes correspondientes a cada una de las concentraciones de inulina de agave utilizadas durante el ensayo y se graficaron en la siguiente figura (figura 14) para su análisis.

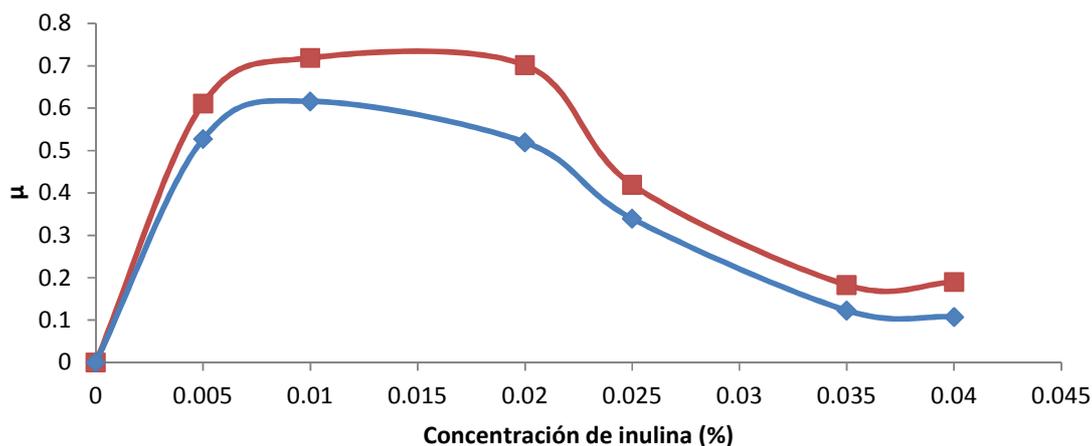


Figura 14. Constante de rapidez de crecimiento contra la concentración del sustrato limitante, a 30°C ■ y 35°C ◆ del microorganismo seleccionado.

La figura 14 relaciona la constante de rapidez del crecimiento del microorganismo en función del tiempo y de la concentración del sustrato. Hay un mejor aprovechamiento de la fuente de carbono en periodos cortos de tiempo, por lo cual se sugiere una mejor producción de enzimas.

Con los resultados obtenidos y analizados en las figuras 13 y 14, se determinó que la mejor concentración de sustrato para la producción de estas enzimas es del 2.0% de inulina de agave, así como también se determinó que la mejor temperatura de incubación fue 30° C.

En la siguiente figura (figura 15) se analizó la concentración de azúcares reductores obtenida en función del tiempo en los ensayos a las

diferentes concentraciones de sustrato en el medio. Se observó, comparándola con la figura 14, que las concentraciones de 3.5% y 4.0% de inulina, presentan valores elevados de azúcares reductores en periodos cortos de tiempo, lo cual nos sugiere un consumo lento de inulina de agave por la saturación del sitio activo de las enzimas producidas durante el crecimiento del microorganismo, lo cual a su vez, indica una probable producción menor de las mismas que en otras concentraciones.

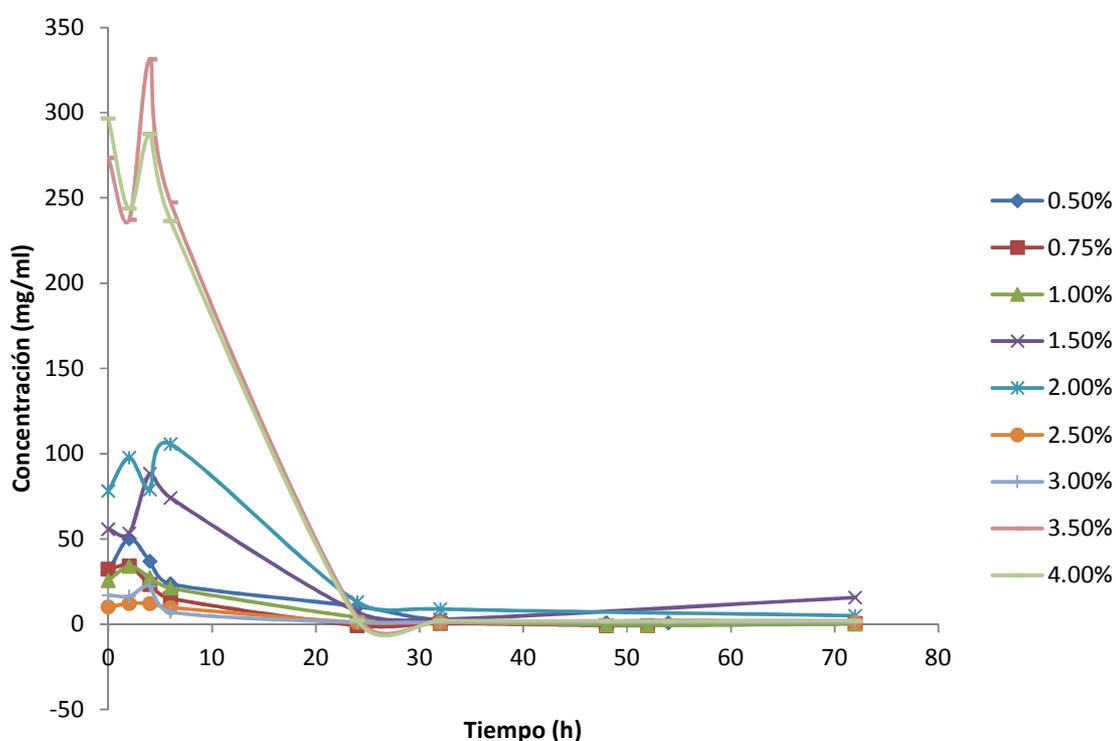


Figura 15. Consumo de inulina de las diferentes concentraciones iniciales de sustrato a diferentes tiempos.

TLC del consumo de inulina del microorganismo seleccionado.

Para finalizar esta segunda parte de la experimentación, una vez más se realizaron las cromatografías correspondientes a los sobrenadantes obtenidos de cada muestra tomada a diferentes tiempos, encontrando

los mismos resultados que en las cromatoplasmas de la figura 11b, (A) en ambas figuras 16 y 17, se observaron señales que comparadas con los controles (figura 11 a), nos sugieren ser pertenecientes a fructosa y/o glucosa, mismas que se hacen menos marcadas a partir de las 24 h y las señales (B) que nos sugieren la presencia de inulooligosacáridos por la polaridad que se demuestra de manera cualitativa.

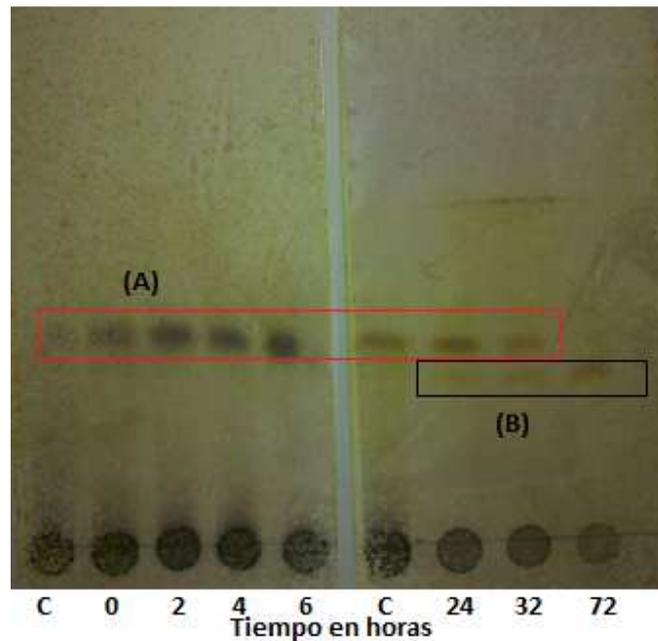


Figura 16. Cromatoplasmas del microorganismo seleccionado a diferentes tiempos (horas), con concentración de 2.00% de inulina. (A) Señales correspondientes a la presencia de monómeros, fructosa y/o glucosa, (B) Señales correspondientes a la presencia de oligosacáridos. (C: Control de inulina de agave a una concentración de 0.01 mg/ml al inicio de cada cromatoplasma).

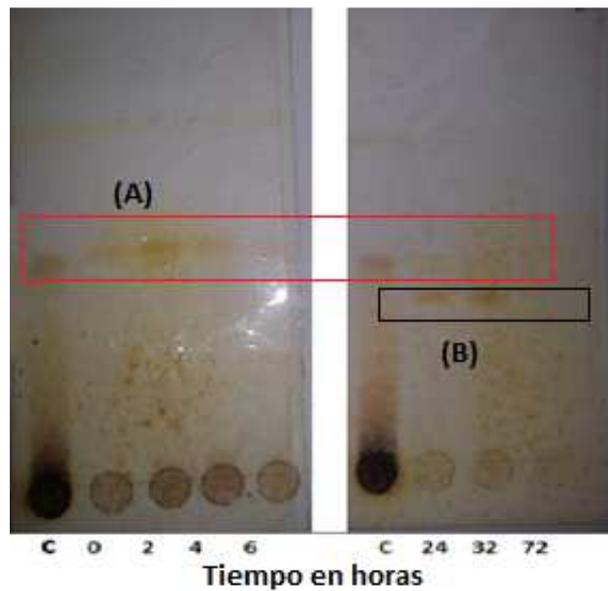


Figura 17. Cromatoplasmas del microorganismo seleccionado a diferentes tiempos (horas), con concentración de 3.00% de inulina. (A) Señales correspondientes a la presencia de monómeros, fructosa y/o glucosa, (B) Señales correspondientes a la presencia de oligosacáridos. (C: Control de inulina de agave a una concentración de 0.01 mg/ml al inicio de cada cromatoplasma).

Ensayo para la cuantificación enzimática.

Se trabajó con un volumen de 40 ml de medio de crecimiento con una concentración de 1% de inulina de agave, pH 5.0, se inoculó con el microorganismo y se incubó durante 24 h, se centrifugó y se filtró para la eliminación total de las células. El sobrenadante se puso a reaccionar con un buffer con inulina de agave disuelta a diferentes concentraciones, siendo estas de 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0%. Se colocaron en siete tubos con tapón de rosca, 1.5 ml del sobrenadante con 1.5 ml de cada uno de los medios en estudio, para la toma de muestras a los tiempos de 0, 2, 4, 6, 8, 24 y 48 h. Transcurrido el tiempo de reacción se sacaron las muestras de incubación y se congelaron a -80°C para detener la reacción, una vez realizado este procedimiento, las muestras se mantuvieron en hielo y se cuantificaron azúcares reductores de cada una de ellas, con las concentraciones de azúcares obtenidas en esta

determinación, se calculó la actividad enzimática de cada una de las muestras (figura 18).

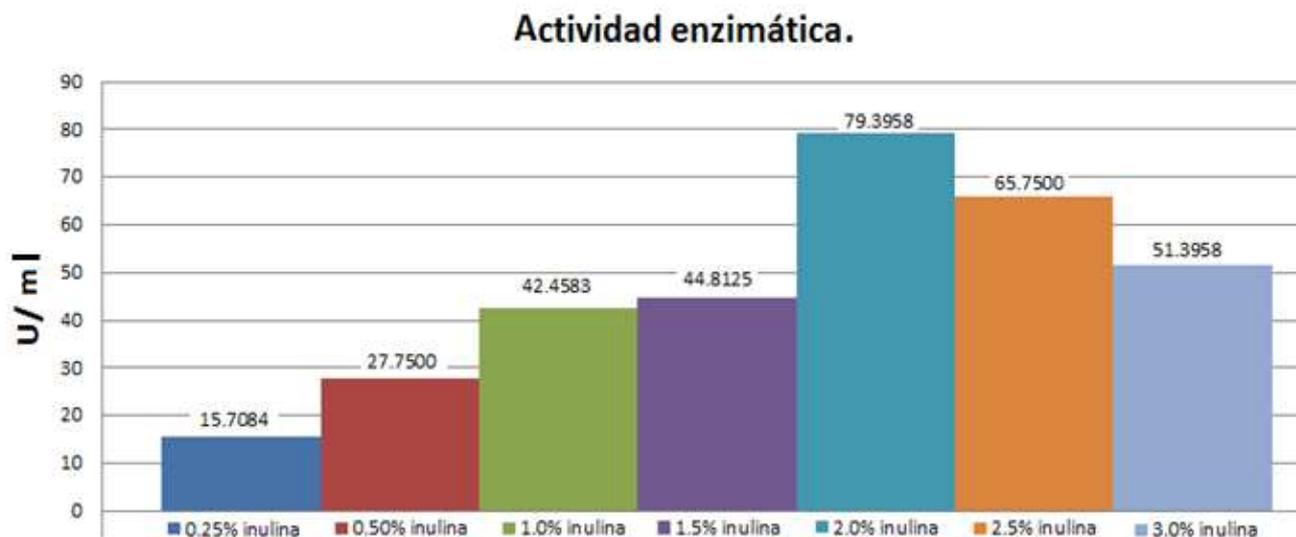


Figura 18. Actividad enzimática de las muestras a diferentes concentraciones de inulina.

En la figura 18 se observó que para el buffer con 2.0% de inulina de agave se obtuvieron 79.3958 U/ml como resultado de la actividad enzimática, resultados que confirman los obtenidos y analizados en la figura 14, ya que en efecto se demostró cómo se mencionó en la sección de dicha figura, que la mejor producción enzimática se da con una concentración de inulina de agave del 2.0%

Los productos de la reacción fueron analizados también por TLC obteniendo los siguientes resultados.

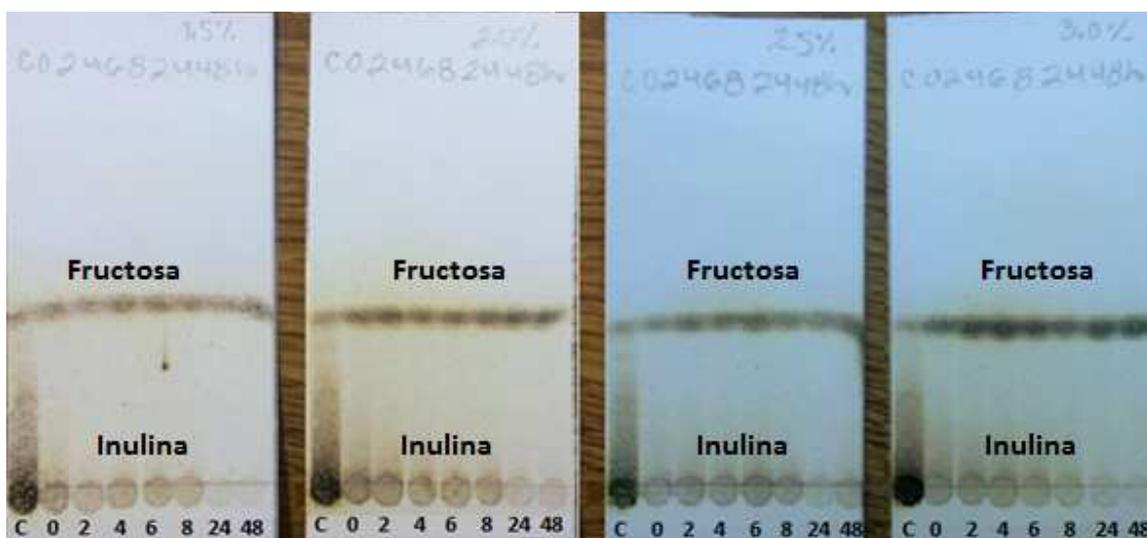
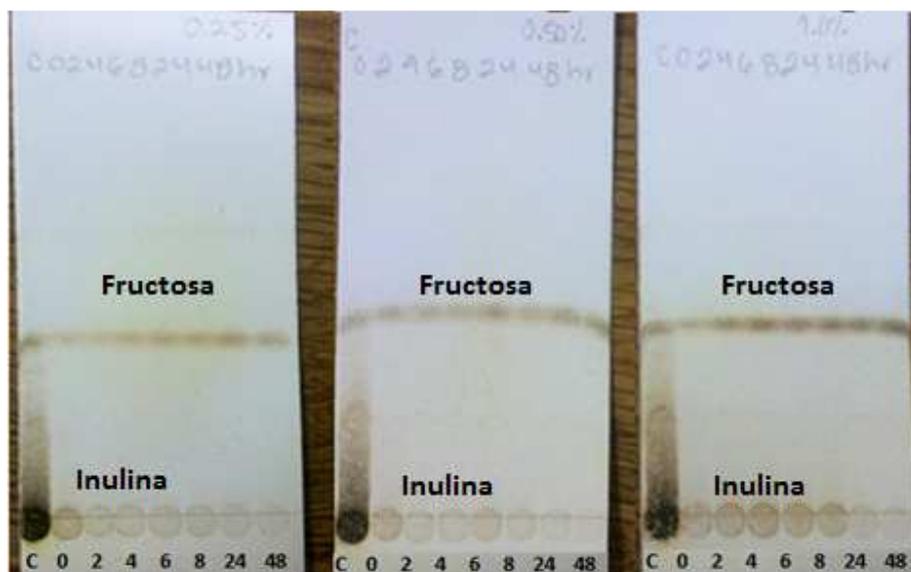


Figura 17a, 17b. *TCL de todas las reacciones a diferentes concentraciones de inulina diluida para el ensayo de actividad enzimática. (C: Control de inulina de agave).*

En las TCL de todas las reacciones con distintas concentraciones de inulina diluida, se observa una única señal a la misma altura para todos los tiempos de reacción, comparando con el control (inulina 0,01 g/ml), se observa claramente como la señal de inulina se hace más tenue con respecto al tiempo y a su vez, con respecto a la concentración de sustrato, mientras que la de los productos (fructosa y/o glucosa) se hace más visible, sin que se muestren otro tipo de productos como

inulooligosacáridos pero sin exentar su presencia, por lo cual, se sugiere que la enzima producida principalmente por este microorganismo es la exo-inulinasa por el incremento de monómeros observados cualitativamente en las TCL realizadas y la relación existente a su vez con la concentración del sustrato como control, ya que este tipo de enzima actúa catalizando la remoción de unidades de fructosa desde el principio hasta el final de la cadena, incluso con la hidrólisis del residuo de sacarosa.

Determinación de proteína por el método de Bradford.

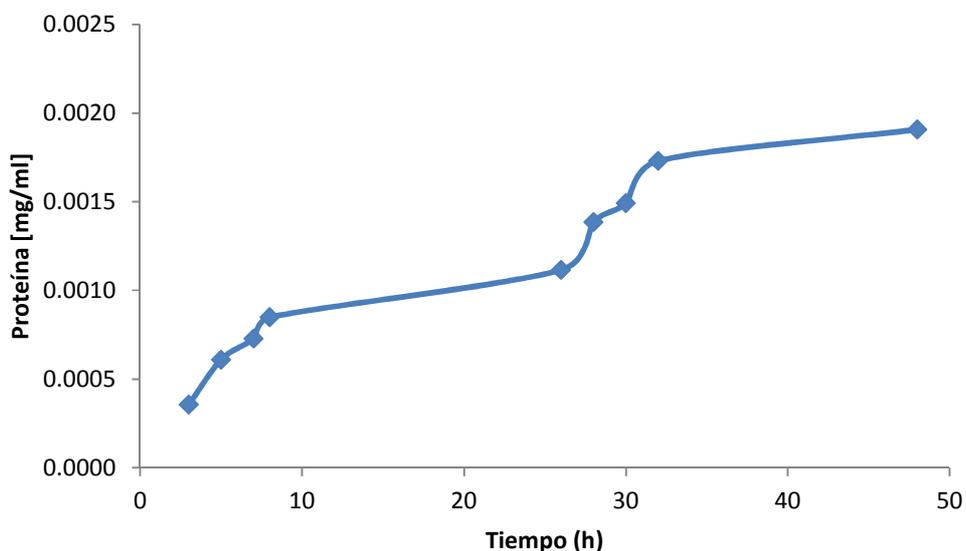


Figura 20. Concentración de proteína presente en la reacción con 2.0% de inulina de agave en función del tiempo.

Como bien se explica en los antecedentes de este trabajo, las enzimas son principalmente proteínas, por lo cual al determinar cuantitativamente la proteína presente en la muestra por el método de Bradford (figura 20), se observó un incremento de proteína en función del tiempo, es decir, la cantidad de enzima en el medio aumenta en función del tiempo de reacción. Esto también se relaciona con el hecho

de que al ser una exo-inulinasa, la producción de la misma es excretada al medio de cultivo (Zavala, 2011) y al no ser retenida en la pared celular del microorganismo es más fácil cuantificarla.

Identificación de la cepa IS03

Para comprobar la pureza de la cepa, una vez descongelada se creció en medio mínimo con inulina y se observó su morfología al microscopio, los microorganismos se tiñeron con safranina con el objetivo de observar que no estuviera contaminado el cultivo y determinar su forma, misma que fue elipsoidal y de agregación típica de las levaduras (figura 21).

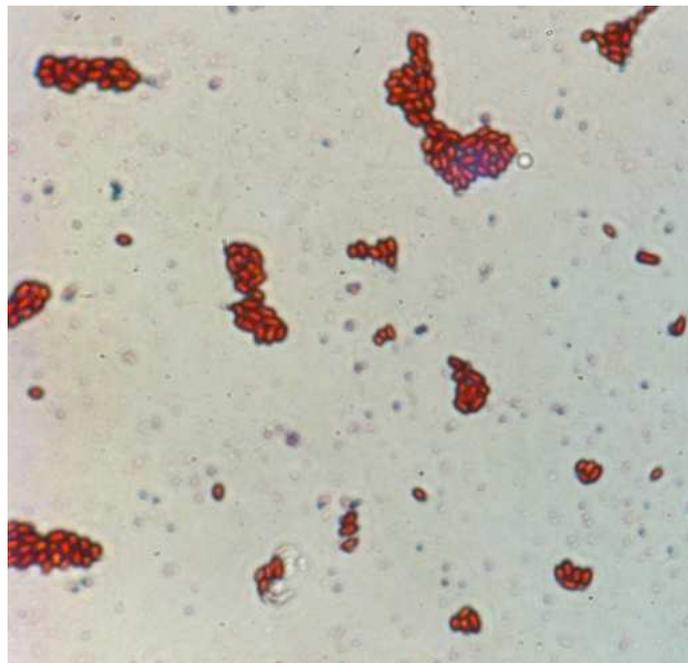


Figura 21. Microscopia óptica de la cepa IS03 teñida con safranina.

Una vez purificado el cultivo, se extrajo el DNA genómico, como se menciona en métodos, utilizando el DNA-zol. Una vez purificado y cuantificado se realizó una reacción de amplificación de DNA (PCR) sobre la región ITS y con ella identificar a la cepa.

Una vez realizada la reacción de amplificación (se hizo por triplicado), se observó que el producto de la reacción tuvo un peso de aproximadamente 700 pb (Figura 22), se han reportado algunos resultados en los que se reporta que el peso oscila entre 700-750 pb (Arratia, 2009; Rodríguez et al., 2010; Segura et al., 2010), teniendo el microorganismo en estudio dentro del rango, por lo cual, los productos de la reacción se purificaron para enviar el DNA a un compañía extranjera (Laragen) para su secuenciación.

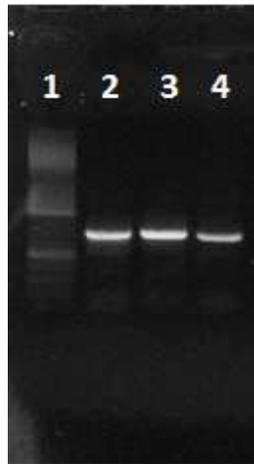


Figura 22. Gel de electroforesis horizontal de DNA. (1) Marcador de Peso Molecular de 100 pb. (2), (3) y (4) Muestra de DNA genómico de la cepa en estudio (IS03).

Con los resultados enviados por la compañía Laragen (Figura 21), la secuencia de bases se introdujo en una base de datos **BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)**, el cual es un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN, ARN o de proteínas, mismo que es capaz de comparar una secuencia problema o secuencia *query* contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en la base de datos. Este programa es de dominio público y puede usarse gratuitamente desde el servidor del Centro Nacional para

la Información Biotecnológica (NCBI). Esto nos permitió comparar nuestra secuencia de datos y obtener los siguientes resultados.

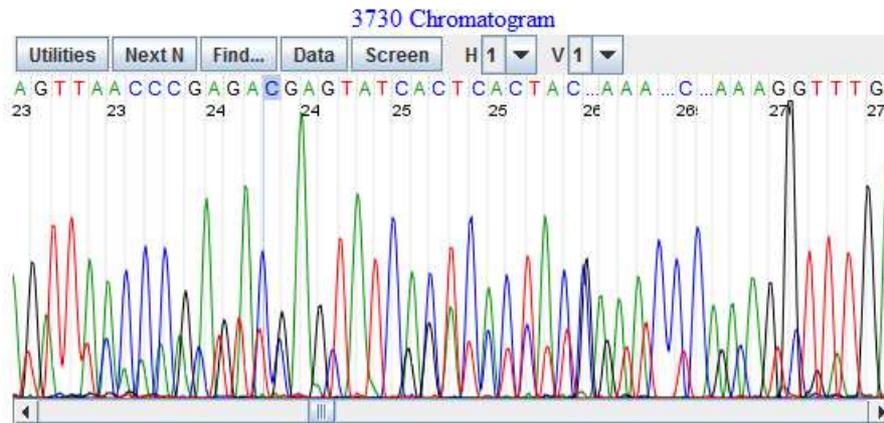


Figura 23. Cromatograma de secuencia de bases de la región ITS de la cepa IS03.

La base de datos nos proporcionó una lista con los posibles géneros y especies de nuestra cepa (Figura 22). De la cual con un 99% de identidad nuestra cepa es *Kluveromyces marxianus*.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments: [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Kluveromyces marxianus strain CHY1612 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; 28S ribosomal RNA gene	1192	1192	98%	0.0	99%	HQ396523.1
Uncultured compost fungus 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), clone NK009_030	1192	1192	98%	0.0	99%	FM177658.1
Kluveromyces marxianus genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene, strain Kw3372	1190	1190	98%	0.0	99%	HE650691.1
Kluveromyces marxianus isolate B-WHX-12-25 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; 28S ribosomal RNA gene	1186	1186	98%	0.0	99%	KC544512.1
Kluveromyces marxianus strain AUMC 7259 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; 28S ribosomal RNA gene	1186	1186	98%	0.0	99%	JQ425346.1
Kluveromyces marxianus strain WM10.112 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; 28S ribosomal RNA gene	1186	1186	98%	0.0	99%	HQ014731.1
Kluveromyces marxianus 26S ribosomal RNA, 18S ribosomal RNA genes, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; 28S ribosomal RNA gene	1184	1184	98%	0.0	99%	AF543841.1
Kluveromyces marxianus genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene, strain Kw1696	1179	1179	98%	0.0	99%	HE650694.1
Kluveromyces marxianus genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene, strain Kw1609	1179	1179	98%	0.0	99%	HE650693.1
Kluveromyces marxianus isolate VA 116042-03 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; 28S ribosomal RNA gene	1179	1179	98%	0.0	99%	AY939806.1
Kluveromyces marxianus isolate KDLYH1-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; 28S ribosomal RNA gene	1177	1177	98%	0.0	99%	JX174415.1

Figura 24. Secuencias de la región ITS de microorganismos con porcentaje de identidad más alto con la cepa a identifica de la base de datos BLAST.

La inulina ha recibido especial atención en la investigación como materia prima renovable, para la producción de bioetanol, IOS y jarabe de fructosa y el uso de este tipo de enzimas producidas por una fuente microbiana, ha demostrado, que por tratamiento hidrolítico rendimientos de hasta el 95% de fructosa pura (Castillo et al., 2010; Ricca et al., 2007). Sin embargo, los resultados que más se han reportado acerca de los microorganismos productores de enzima han sido para estudios realizados con fuentes distintas a la inulina de agave, como la inulina extraída de Yacón, dhalia, espárragos, achicoria, entre otras.

La evaluación de la producción de una enzima por fermentación microbiana se determina por los parámetros de rendimiento de la enzima obtenida y por las propiedades de la enzima que dependen del tipo de microorganismo empleado, del modo de fermentación, del medio de cultivo y las condiciones de incubación.

Es importante mencionar los azúcares de agave son referidos comúnmente como inulina dentro de la industria tequilera, pero como fructanos de la serie de inulina, solo representan una fracción del contenido total de fructano. Los fructanos de naturaleza proveniente del A. tequilana Weber var. Azul, son más complejos que otras especies de agave, contienen mezclas fuertemente ramificadas de fructanos y agavinas con enlaces B-(2-1) y B-(2-6) entre las fracciones de fructosa. (Waleckx et. al., 2008).

Una gran cantidad de artículos se han publicado en diferentes fuentes científicas, en los cuales se habla de la excelente producción enzimática e incluso del aislamiento de dichas enzimas producidas por diversas fuentes microbianas, siendo *Kluyveromyces marxianus* la levadura más estudiada, debido a que la inulinasa es una enzima nativa de este microorganismo, y a su vez, la más adecuada para aplicaciones

industriales ya que la velocidad de crecimiento de este microorganismo es mejor que cualquier otro microorganismo eucarionte, es termotolerante, con habilidad de crecer sobre los 52° C, tiene la capacidad de asimilar un amplio rango de azúcares claves como la lactosa y la inulina, tiene una alta capacidad secretoria de enzimas líticas entre las cuales es importante resaltar que la inulinasa es una enzima nativa. Este conjunto de características hacen de este microorganismo, líder de todas las levaduras para muchos procesos biotecnológicos (Castillo et al., 2010).

Hay una variación en los resultados de los estudios reportados, debido a que el tipo de sustrato tiene efecto sobre la naturaleza extra e intercelular de la enzima, las levaduras producen ambas enzimas tanto en el medio de cultivo como en el interior de la célula (Castillo et al., 2010), pero bajo condiciones diferentes y en cantidades variantes.

En la siguiente tabla se muestran algunas condiciones de crecimiento y de producción enzimática de diversas variedades de *Kluyveromyces*, incluidas las obtenidas en este trabajo (tabla 3).

Tabla 3. Condiciones de crecimiento para algunas especies de *K. marxianus*.

Microorganismo	Rango de pH	Temperatura (°C)	Fuente
<i>K. fragilis</i>	3.5-6	30-40°	Zavala, 2011
<i>K. fragilis</i>	5-5.2	55°	Zavala, 2011
<i>K. fragilis</i>	5.5	60°	Zavala, 2011
<i>k. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i>	3.5	20-40°	Castillo et al., 2010
<i>k. marxianus</i> YS-1	4.4-6.5	30°	Castillo et al., 2010
<i>K. marxianus</i> JMRR	3.5-5	30°	Resultados obtenidos en este trabajo

Los rangos de temperatura son muy amplios, esto por tratarse de un microorganismo termorresistente, sin embargo también se resalta que las variaciones en las condiciones de crecimiento vienen siendo dadas por el uso de un sustrato diferente.

Por otro lado, se han reportado los rendimientos de la enzima producida por distintas variedades de *K. marxianus*.

Tabla 4. Rendimientos de la enzima producida por *K. marxianus* (Castillo et al., 2010)

Microorganismo	Rendimiento (U/ml)
<i>K. marxianus</i> ATCC36907	260
<i>K. marxianus</i> CDBB-L278	82
<i>K. marxianus</i> UCD(FST) 55-82	212
<i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaris</i>	107
<i>K. marxianus</i> ATCC 16045	121
<i>K. marxianus</i> (A1 y A2)	32
<i>K. marxianus</i> YS-1	50.2
<i>K. marxianus</i> JMRR	79.39

Hay una gran variedad dentro de los rendimientos de la enzima producida por el microorganismo en estudio, no existe como tal una comparación por la diversidad de especies, pero se puede observar en la figura 26 que se podría seleccionar como un buen candidato para la producción de enzimas recordando que esta depende del origen del sustrato.

Conclusiones.

De una serie de 8 microorganismos aislados del bagazo de agave proveniente del deshecho de la industria tequilera, misma que usa Agave Tequilana Weber var. Azul como materia prima y que es un recurso que contiene cantidades elevadas de azúcares que no se utilizaron durante el proceso industrial, se seleccionó la cepa IS03 por su capacidad de producción de inulinasas con la inulina de agave como única fuente de carbono.

Este microorganismo es capaz de consumir el 100% de inulina en tiempos cortos (24 h), lo cual lo hace un excelente candidato para la producción de las enzimas de interés, la temperatura de crecimiento determinada en este trabajo fue de 30° C, con una concentración de inulina de agave en el medio de 2.0%, con un pH variante de 3.5-5, ya que bajo estas condiciones y concentración de sustrato, se obtuvieron 79.3958 U/ml. Se sugiere que el microorganismo en estudio presenta una producción de enzima de tipo exo, ya que hubo una producción elevada de monómeros, esto debido a su acción en la formación de productos por la catálisis en la remoción de unidades de fructosa desde el inicio y hasta el final de la cadena, mismo resultado que fue determinado cualitativamente por TCL.

Se observó la morfología del microorganismo IS03 y se determinó que es una levadura para su identificación por medio de métodos moleculares, con la finalidad de conocer género y especie, se caracterizaron los extractos celulares amplificando la región ITS (Internal Transcribed Spacer) por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), determinando que se trata del microorganismo *Kluyveromyces marxianus*.

Perspectivas finales.

Se ha estudiado una gran variedad de microorganismos, bacterias, hongos y levaduras, para el aprovechamiento de recursos naturales e incluso desechos agroindustriales, en base a la producción de enzimas capaces de hidrolizar polímeros de azúcares, generando principalmente bioetanol, jarabe de fructosa, entre otros, sin embargo este tipo de estudios son amplios para fructanos provenientes de plantas.

El estudio de microorganismos capaces de producir enzimas con amplios sectores alimenticios y que son aislados de desechos industriales, hace más interesante este tipo de estudios, ya que se puede dar un uso benéfico con costos bajos a la industria alimentaria y en la producción de alimentos con bajo contenido energético.

El buscar las condiciones adecuadas de crecimiento y producción de enzimas es tan solo el inicio de una línea de investigación, se deben purificar las enzimas y cuantificar los productos asociados, de esta manera podremos tener aplicaciones diversas dentro de la industria alimentaria e incluso de otros sectores.

Referencias

- Arratia, J. 2009. Diversidad Genética de levaduras involucradas en la fermentación del mezcal Tamaulipeco.
- Audesirk, T., Audesirk, G. 2003. *Biología. La vida en la tierra*. Editorial Prentice Hall. 6a. edición.
- Bernard, A., Ferda, M. 1991. *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*. Segunda edición, p. 1271.
- Calderón, A., Chamy, M., 2010. Scientia Agropecuaria Inulinase production by yeast *Kluyveromyces marxianus*, 1, 235–245.
- Calderón, C. 2013. Selección y caracterización de cepas fermentadoras para su aplicación en la producción de Bioetanol. UNAM.
- Cazetta, M., Monti, R., Contiero, J. 2010. Effects of culture conditions on the production of inulinase by *Kluyveromyces marxianus*. *Food / Feed Science and Technology*.
- Chacón, A. 2006. Perspectivas agroindustriales actuales de los oligofruetosacáridos (FOS)., 17(2), 265–286.
- Corona, R., Pelayo, C., González, V., Zuñiga, V. 2005. Optimización de la producción de inulasas por *Saccharomyces sp.*, a partir de Agave tequilana Weber var. azul.
- Fabiel, D. (n. d.). Modelo de Monod. Retrieved from <http://www.buenastareas.com/ensayos/Definiciones/5847499.htm>
I Fecha de consulta: junio 2013
- Franck, A. 2002. Technological functionality of inulin and oligofruetose. *NCBI*.
- García, M., Quintero, R., López, A. 2004. *Bioteología alimentaria*. Editorial Limusa. 5a Edición.
- Higgins, L. 2012. PCR amplification of fungal ITS1 and/or ITS2 rDNA gene regions (p. 3).

- IUBMB Enzyme Nomenclature. (1961). No Title. *EC 3.2.1.7*. Retrieved from <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/2/1/7.html>. Fecha de consulta: junio 2013.
- Berg, J., Stryer, L. 2008. *Bioquímica*. Editorial Reverté. 6a Edición.
- Kaur, N., Gupta, A. 2002. Applications of Inulin and Oligofructose in Health and nutrition.
- Kawamara, M., Uchiyama, T., Kuramoto, T., Tamura, Y., Mizutani, K. 1989. Formation of cycloinulo-oligosaccharide from inulin by an extracelular enzyme of *Bacillus circulans* OKUMZ 31B.
- López, M. 2012. Producción enzimática de fructooligosacáridos, 1–103.
- López, M., Mancilla, N., Mendoza, G. 2003. Molecular structure of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. *Agricultural and Food Chemistry*.
- Madrigal, L., Sangronis, E. 2007. La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales, *57(2)*, 387–396.
- Nagem, R., Rojas, L., Golubev, M., Korneeva, O., Eneyskaya, E., Kulminskaya, Polikarpov, I. 2004. Crystal structure of exo-inulinase from *Aspergillus awamori*: the enzyme fold and structural determinants of substrate recognition. *Journal of molecular biology*, *344(2)*, 471–80.
- Nelson, D., Cox, M. M. (2005). *Lehninger Principios de Bioquímica*. (Omega, Ed.) (4ª edición.).
- Nguyena, Q., Rezessy-Szabóa, J., Czukorb, B., & Hoschkea, Á. (2011). Continuous production of oligofructose syrup from Jerusalem artichoke juice by immobilized endo-inulinase.
- Pérez, A., Torres, A., Baca, B. 1995. Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR). *Elementos*, 23.

- Ricca, E., Calabro, V., Curcio, S., Loiro, G. 2007. The state of the art in the production of fructose from inulin enzymatic hydrolysis. *NCBI*, 129–145.
- Rodríguez, E., Muro, C., Arias, A. 2010. Identificación molucara de levaduras aisladas de tepache casero.
- Segura, L., Kirchmayr, M., Flores, E., Gschaedler, A. 2010. PCR-RFLP de las regiones ITS-5.8S como herramienta de identificación de levaduras: ventajas y desventajas.
- Singh, P., Gill, P. 2006. Production of Inulinases: Recent Advances, 44(2), 151–162.
- Sumat, J., Naveen, K. 2012. Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using dahlia tuber extract., 62–69.
- Waleckx, E., Gschaedler, A., Colonna, B., Monsan, P. 2008. Hydrolysis of fructans from Agave tequilana Weber var. azul during the cooking step in a traditional tequila elaboration process. *Food Chemistry*, 108(1), 40–48.
- Waterhouse, A., Chatterton, N. 1993. Glossary of fructans terms, in Science and Technology of fructans. *Agricultural and Food Chemistry*, 2–7.
- Zavala, M. 2011. Caracterización de inulinasa de *Kluyveromyces fragilis* CDBL-278 y de invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* por difracción circular.

Anexo 1. Determinación de azúcares reductores por la técnica de Miller o DNS.

Los azúcares reductores poseen un grupo carbonilo libre formando un grupo hemiacetal que le confiere la característica de poder reaccionar con otros compuestos. La determinación de estos azúcares se realizó con el objeto de obtener una curva de calibración aplicando la técnica de Miller o DNS (ácido dinitrosalicílico) para obtener la concentración de las muestras, reactivo que tiene la capacidad de oxidar a los azúcares reductores dando resultados colorimétricos que se pueden medir con una longitud de onda de 540nm.

Esta técnica sirve para cuantificar los azúcares reductores producidos durante una fermentación o para cuantificar los productos de una reacción enzimática.

La forma en que procede la reacción no es estequiométrica y depende de la estructura del azúcar, por lo tanto se realiza una curva patrón (Nielsen, 1998).

El reactivo de DNS se preparó con los siguientes reactivos:

- 1.06 g del reactivo DNS.
- 1.98 g de NaOH.
- 30.6 g de Rochsal.
- 0.76 ml de fenol.
- 0.83 g de Na₂SO₃.
- 141.6 ml de agua.

La determinación de azúcares reductores presentes durante el crecimiento de los microorganismos como durante la reacción enzimática se realizó como sigue:

- En un tubo de ensaye con tapa de rosca, agregar 25 µl de muestra 1 mL de reactivo a 1 mL de muestra usando tubos tapa rosca.
- Agregar 50 µl del buffer de acetatos al 10%.
- Agregar 150 µl del reactivo de DNS.
- Poner en calentamiento durante 5 minutos en baño de agua.
- Detener la reacción en un baño con hielo y mantener en reposo durante 15 minutos.
- Agregar 10 ml de agua destilada y medir absorbancia a 540 nm contra el blanco obtenido en el procedimiento anterior.

Al mismo tiempo se elaboró una curva patrón de fructosa e inulina, empleando como stock una solución de 0.1 g/mL (figura 25).

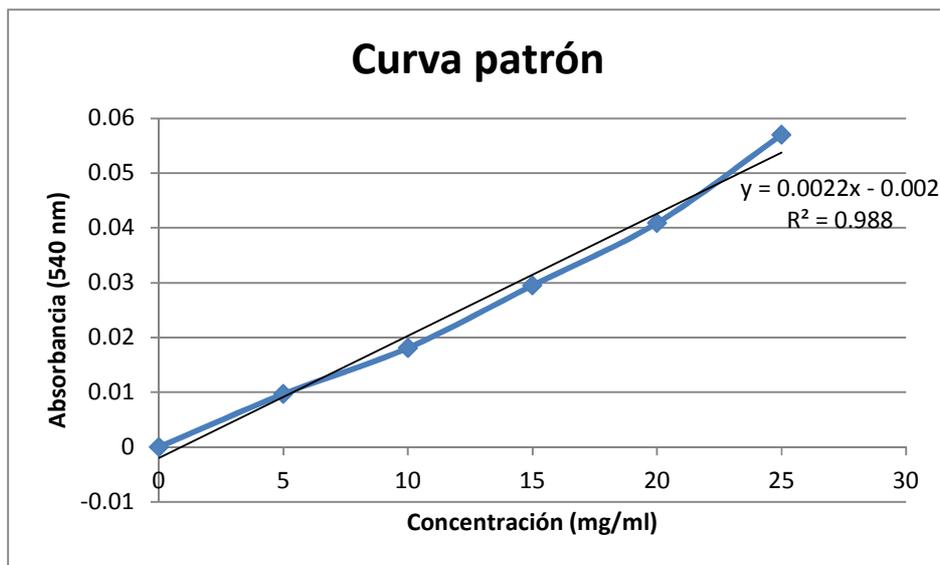


Figura 25. Ejemplo de una curva patrón utilizada para determinar las concentraciones de azúcares reductores de las muestras en estudio.

La concentración se obtiene a partir de la recta producto de realizar la curva de calibración, que correlaciona la Absorbancia medida a 540 nm con la concentración de fructosa o inulina.

Cabe señalar que se empleó el sobrenadante para la determinación de la inulina restante en el medio y todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

Con la finalidad de conocer el perfil carbohidratos que resultaron del consumo durante el crecimiento microbiano o de la hidrólisis enzimática de la inulina de agave, se realizó una cromatografía de capa fina con el sobrenadante de las muestras a los distintos tiempos. Esto nos permitió conocer de manera cualitativa la degradación de inulina y determinar la producción de inulinasas, para este método se utilizó como control el medio líquido con inulina al 0.5%.

Anexo 2. Cromatografía de líquidos en capa fina.

La cromatografía se define como la separación de una mezcla de dos o más compuestos por distribución entre dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra una fase móvil.

Todas las técnicas cromatográficas dependen de la distribución de los componentes de la mezcla entre dos fases inmiscibles: una fase móvil, llamada también activa, que transporta las sustancias que se separan y que progresa en relación con la otra, denominada fase estacionaria. La fase móvil puede ser un líquido o un gas y la estacionaria puede ser un sólido o un líquido.

Todos los sólidos finalmente tienen el poder de adsorber en mayor o menor grado otras sustancias sobre su superficie; y, similarmente todas las sustancias pueden ser adsorbidas, unas con más facilidad que otras. Este fenómeno de adsorción selectiva es el principio fundamental de la cromatografía.

Para este trabajo se utilizaron cromatoplasmas TLC Silica gel 60 F₂₅₄ de 10 cm x 5 cm, marca MERCK, usando como fase móvil una mezcla de Butanol-Metanol-Agua en proporción 3:2:1. Posteriormente las placas fueron eluidas durante aproximadamente 40 minutos cada una y se revelaron con una solución de H₂SO₄ al 5% y Orcinol (10mg/ml) aplicada con un aspersor para un recubrimiento uniforme en las placas y finalmente se calentaron con una parrilla para facilitar la reacción.

En este proyecto se utiliza la cromatografía en capa fina (ccf), la cual consiste en una placa recubierta con fase estacionaria manteniendo un pequeño espesor constante a lo largo de la placa. El eluyente asciende,

por capilaridad, por la placa y arrastra los componentes a lo largo de ésta produciendo "manchas" de los componentes.

En la ccf, el grado de elución de las sustancias depende tanto de su propia polaridad como de la polaridad del eluyente utilizado.

El eluyente debe ser evaporado en su totalidad antes de aplicar el revelador, mismo que se evapora con calor para la revelación de las señales de interés.

Anexo 3. Determinación de proteínas por el método de Bradford.

El método de Bradford es un método colorimétrico ampliamente usado ya que es simple, rápido, barato y sensible. Es necesario construir una curva de calibración para determinar la concentración de las muestras que pueden ser cuantificadas con el método. El método se basa en la unión específica del colorante azul de Coomassie brillante G250 (CBBG) a los residuos de Arg, Trp, Tyr, His y Phe de las proteínas. El CBBG se une a los residuos de las proteínas produciendo una absorbancia máxima a 595 nm, mientras que el colorante libre tiene una absorbancia máxima a 470 nm. A diferencia del Lowry (otra técnica colorimétrica para determinar proteínas) que es muy sensible a la composición de la solución que acompaña a las proteínas, el Bradford solo es afectado por algunos detergentes. Una de las desventajas del Bradford es que el colorante CBBG se une fuertemente a las cuvetas de cuarzo, es por ello que se recomienda usar vidrio o cuvetas de polipropileno para facilitar así su limpieza con un poco de alcohol.

Se requiere que las muestras se encuentren en congelación para que la temperatura no las afecte y solo descongelar la fracción que se utilizará pero manteniéndolas en hielo, el reactivo de Bradford debe ser manejado con mucho cuidado ya que contiene ácido fosfórico.

También es importante saber que a medida que el tiempo transcurre, la absorbancia se incrementa, por lo que las muestras no pueden ser incubadas por un lapso mayor a 1 h, y mínimo se deben esperar 5 min para su posterior lectura en el espectrofotómetro a 595 nm.

Tabla 5. Reactivos y cantidades para la realización de la curva de calibración.

Tubo	H2O (µl)	BSA (µl)	Reactivo de Bradford (µl)
Blanco	2400	0	600
1	2310	90	600
2	2280	120	600
3	2220	180	600
4	2160	240	600
5	2100	300	600
Muestra	1400	1000	600

Los resultados se grafican, de la curva patrón se obtiene la ecuación de la recta y con ella se determina la concentración de proteína en la muestra para posteriormente también graficar los resultados para su análisis.

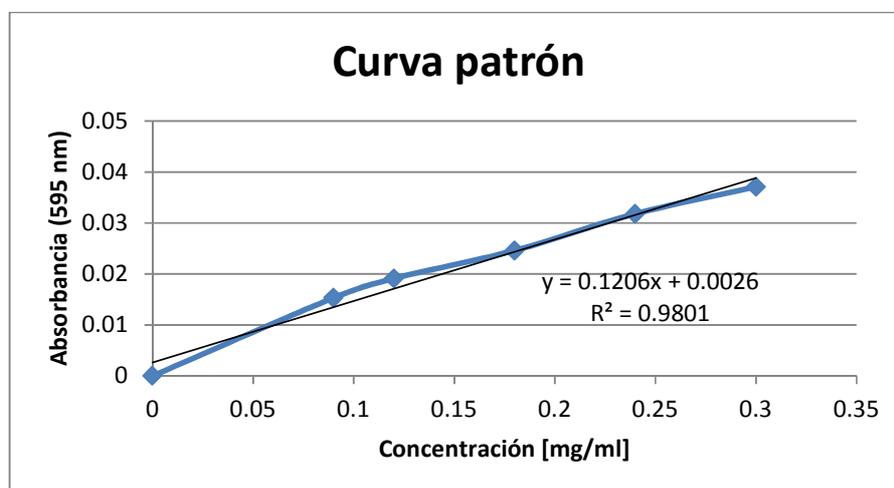


Figura 26. Ejemplo de curva patrón utilizada para determinar las concentraciones de proteína en las muestras en estudio.

Anexo 4. PCR.

Primera parte.

- Centrifugar 2ml durante 5 minutos a 10000 rpm de un cultivo.

Para separar las células del microorganismos del medio de cultivo.

- Se deshecha el sobrenadante del medio.
- Se agrega a las células precipitadas solución amortiguadora y sustancias de lisis.

El amortiguador ayuda a quelar el magnesio para no producir cofactores que degraden el DNA y las sustancias de lisis como su nombre lo dice ayudan a lisar las células.

- Se centrifuga durante un minuto.
- Se traspasa todo el contenido centrifugado a un tubo que contiene partículas pequeñas que parece tierra muy fina (fibra de vidrio).

La tierra fina ayuda a la lisis, rompiendo con las paredes y membranas de las células con ayuda de fuerza mecánica.

- Se centrifuga nuevamente.

Con la centrifugación podemos separar fácilmente el líquido del precipitado, quedando en la parte líquida el DNA puesto que es polar y en el precipitado quedan los restos celulares que no nos interesan.

- Trasferimos el sobrenadante a otro microtubo agregándole 100µM de solución MD2.

La solución MD2 es un solvente orgánico el cual crea un equilibrio de partición orgánico e inorgánico que también ayuda a precipitar todo el material celular que aún pueda presentar.

- Colocar el tubo durante 1 minuto dentro del refrigerador y centrifugar.

Este paso nos ayuda a seguir purificando, precipitando el componente orgánico, es decir el material celular que no nos interesa, dejando cada vez más puro el DNA en la fase líquida.

- Trasferimos a un tubo nuevo todo el líquido de 400 – 450µM agregándole la solución MD3 y colocar en el vortex durante 5 segundos.
- Agregar 700 al spin filter.

El spin filter es una columna cromatográfica iónica y la solución salina que contiene dicha columna ayuda a exponer más la carga del DNA.

- Centrifugar 30 segundos y realizar la primera carga, pasando el contenido del microtubo por un filtro.

La técnica de filtrado ayuda a seguir purificando de manera que todo lo que pasa por el filtro son los restos que no nos interesan y lo que se queda en el filtro es el DNA.

- Se realiza una segunda carga.
- Se agrega 300 µM de la solución MD4 dentro del filtro y centrifugar.

La solución MD4 ayuda a limpiar el DNA eliminando el exceso de solución salina.

- Se desecha el filtrado.
- Pasar 50 µM spin filter.
- Eluir con MDA al centro del spin filter y centrifugar.

EL MDA es un solvente orgánico no polar como fase de recuperación.

- Almacenar el refrigerador a una temperatura de -20°C.

Segunda parte.

- Se realiza la mezcla de reacción. Mezclando en un microtubo de 1.5: Templado, amortiguador, magnesio, dNTPs.
- Centrifugar ligeramente, un "pin".
- Colocar en termo-ciclador.

Donde se abre la cadena del DNA a temperaturas de 96 C, se alinean los primers a 52° C y comienza la replicación en ciclos de altas y bajas temperaturas.

Tercera parte.

- Se arma la cámara de electroforesis.

La cámara aplica un campo eléctrico creando la migración del DNA. Considerando que la cámara contiene un polo positivo y otro negativo y el DNA tiene carga negativa por parte del grupo fosfato, entonces el DNA migrara hacia el ánodo.

- Se realiza la preparación del gel de agarosa al 1% usando TBE como amortiguador, obteniendo medio líquido que se deja enfriar a una temperatura aproximadamente de 40° C.
- Se le agrega al gel 50ul de bromuro de etilo antes de que solidifique el gel y se coloca en la charola de la cámara.
- Se asegura de que se cubra $\frac{3}{4}$ partes de los peines.
- Se permite que solidifique el gel.
- Se retiran cuidadosamente los peines sin romper el gel.

Al retirar los peines se obtienen los pozos.

- Se agrega 2ml de amortiguador TBE 1x cubriendo el gel agarosa.

Para generar el campo eléctrico.

- Centrifugamos el producto de PCR.
- Sobre un trozo de papel parafilm se mezcla sin burbujas 3 μ l de colorante de carga (ficol – EDTA – SDS- azul bromofenol) con 5 μ l de del producto PCR.

El colorante contiene ficol, el cual es similar a glicerol es denso y por peso este cae dentro del pozo, el colorante tiene la misma carga que el DNA por lo que migra a la par y permite visualizar en donde colocar el DNA más fácil.

- Se toma la mezcla con micropipeta y se coloca dentro del pozo de gel, sin tocar el gel.
- Se coloca la tapa de la cámara.
- Se conecta el plug.
- Se enciende la fuente ajustando velocidad 1 – 10 v/cm.