



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ENZIMAS
DEGRADORAS DE INULINA
(INULINASAS)**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

AMAYELLI GUILLÉN BECERRIL



MÉXICO, D.F. ABRIL 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Aguilar Osorio José Guillermo de Jesús

VOCAL: Ruiz Terán Francisco

SECRETARIO: Montiel Pacheco Carmina

1º SUPLENTE: Camacho de la Rosa Norma Angélica

2º SUPLENTE: Domínguez Valdez Verónica

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:
LABORATORIO 314, EDIFICIO E, FACULTAD DE
QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. CARMINA MONTIEL PACHECO

SUSTENTANTE:

AMAYELLI GUILLÉN BECERRIL

CONTENIDO

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 1 |
| 1. ANTECEDENTES..... | 3 |
| 1.1. Agave | 3 |
| 1.2. Fructanos | 4 |
| 1.3. Inulina y fructooligosacáridos | 7 |
| 1.4. Inulinasas | 10 |
| 1.4.1. <i>Kluyveromyces</i> como productoras de inulinasa..... | 14 |
| 1.5. Cromatografía de intercambio iónico..... | 16 |
| 1.6. Electroforesis | 18 |
| 1.6.1. Gel de poliacrilamida | 18 |
| 2. JUSTIFICACIÓN..... | 21 |
| 3. HIPÓTESIS..... | 22 |
| 4. OBJETIVOS..... | 22 |
| 4.1. Objetivo general | 22 |
| 4.2. Objetivos particulares..... | 22 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 23 |
| 5.1. Purificación de la mezcla comercial de inulinasas Novozym 960 como control positivo de la purificación de enzimas de <i>K. marxianus</i> | 23 |
| 5.1.1. Evaluación de la actividad enzimática por análisis de azúcares reductores por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS)..... | 23 |
| 5.1.2. Identificación de los productos de hidrólisis por TLC..... | 23 |
| 5.1.3. Determinación de la concentración de proteína..... | 24 |
| 5.1.4. Precipitación de la proteína por saturación de sal. | 24 |
| 5.1.5. Diálisis de las fracciones de purificación y mezcla novozyme 960 | 24 |
| 5.1.6. Purificación de endo y exo inulinasas por cromatografía de intercambio aniónico | 25 |
| 5.2. Extracción y purificación de las enzimas degradadoras de inulina de agave provenientes de <i>Kluyveromyces marxianus</i> | 25 |
| 5.2.1. Crecimiento microbiano e inducción de inulinasas | 25 |
| 5.2.2. Separación de células del medio de cultivo y ruptura de células..... | 26 |
| 5.2.3. Medición de actividad hidrolítica | 27 |

| | | |
|--------|---|----|
| 5.2.4. | Cromatografía de intercambio aniónico por FLPC..... | 27 |
| 5.2.5. | Identificación de los productos de hidrólisis por HPLC | 28 |
| 6. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 29 |
| 6.1. | Purificación de inulinasas de una mezcla comercial, Novozym 960 de <i>Aspergillus niger</i> | 29 |
| 6.1.1. | Metodología de purificación | 29 |
| 6.1.2. | Detección de las inulinasas novozym 960 por SDS PAGE..... | 38 |
| 6.1.3. | Separación de las proteínas por FPLC..... | 40 |
| 6.2. | Extracción y purificación de inulinasas a partir de cepas de <i>Kluyveromyces marxianus</i> | 42 |
| 6.2.1. | Evaluación de actividad enzimática | 42 |
| 6.2.2. | Intercambio aniónico por FPLC | 44 |
| 6.2.3. | Determinación del contenido de proteína | 50 |
| 6.2.4. | Identificación de Productos de hidrólisis por HPLC | 53 |
| 6.2.5. | Electroforesis SDS PAGE de los extractos celulares ISO3 y AZ8 | 57 |
| 7. | CONCLUSIONES | 59 |
| 8. | PERSPECTIVAS | 60 |
| 9. | BIBLIOGRAFÍA..... | 61 |
| 10. | ANEXO DE GRÁFICAS Y FIGURAS | 66 |
| 11. | ANEXO DE METODOLOGÍAS..... | 68 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estructuras de los fructanos de inulina y levana (Olvera et al, 2007)..... | 4 |
| Figura 2. Estructuras propuestas de los fructanos para inulina de agave (agavina) y graminan. Las dos últimas se encuentran en Agave spp. (Mancilla et al; 2006), (Muñoz-Gutiérrez et al; 2009..... | 9 |
| Figura 3 Representación la endo y exo inulinasa. Izquierda endoinulinasa de <i>Aspergillus ficuum</i> , derecha exoinulinasa de <i>Aspergillus awamori</i> mostrando la fructosa (verde) en el sitio activo. (3SC7 y IY9G del PDB) | 14 |
| Figura 4 Interacción de la fase estacionaria en cromatografía de intercambio iónico | 17 |
| Figura 5. Cromatopla de los productos de reacción con inulina de achicoria al 0.5%, utilizando la mezcla Novozym960. Temperatura: 50°C, buffer de acetatos 20 mM, pH 5.5..... | 30 |
| Figura 6 Cromatopla de los productos de reacción con inulina de agave al 0.5%, utilizando la mezcla Novozym960. Temperatura: 50°C, buffer de acetatos 20 mM, pH 5.5..... | 30 |
| Figura 7. Cromatopla de los productos de reacción de las fracciones del precipitado al 65% de saturación. La reacción se llevó a cabo con 0.5% de inulina de achicoria, a 50°C, buffer de acetatos 20 mM, pH 5.5. En cada carril se aplicaron las fracciones eluidas con las diferentes concentraciones de NaCl. En el primer carril de izquierda a derecha se aplicó la reacción del lavado inicial (LI) y en el último carril la fracción del lavado final (LF)..... | 31 |
| Figura 8. Cromatopla de los productos de reacción de las fracciones del precipitado al 80% de saturación. La reacción se llevó a cabo con 0.5% de inulina de achicoria, a 50°C, buffer de acetatos 20 mM, pH 5.5. En cada carril se aplicaron las fracciones eluidas con las diferentes concentraciones de NaCl. En el primer carril de izquierda a derecha se aplicó la reacción del lavado inicial (LI) y en el último carril la fracción del lavado final (LF)..... | 33 |
| Figura 9. Cromatopla de los productos de reacción de las fracciones del precipitado al 95% de saturación. La reacción se llevó a cabo con 0.5% de inulina de achicoria, a 50°C, buffer de acetatos 20 mM, pH 5.5. En cada carril se aplicaron las fracciones eluidas con las diferentes concentraciones de NaCl. En el primer carril de izquierda a derecha se aplicó la reacción del lavado inicial (LI) y en el último carril la fracción del lavado final (LF)..... | 34 |
| Figura 10. Gel de poliacrilamida con la mezcla comercial Novozym 960 a la izquierda y marcador de BSA a la derecha. | 38 |
| Figura 11. Gel de poliacrilamida con las fracciones colectadas de la purificación por columna aniónica, que se identificaron como lavado inicial, 0.2M, 0.3M, 0.5M, | |

| | |
|---|----|
| 0.7M, 1.0M y lavado final que van de izquierda a derecha para el 1° precipitado a 65% de saturación..... | 39 |
| Figura 12. Gel de poliacrilamida con las fracciones colectadas de la purificación por columna aniónica, que se identificaron como lavado final, 1M, 0.7M, 0.5M, 0.3M, 0.2M y lavado inicial que van de izquierda a derecha, para el 2° precipitado a 80% de saturación..... | 39 |
| Figura 13. Gel de poliacrilamida con las fracciones colectadas de la purificación por columna aniónica, que se identificaron como lavado final, 1M, 0.7M, 0.5M, 0.3M, 0.2M y lavado inicial que van de izquierda a derecha, para el 3° precipitado a 95% de saturación..... | 39 |
| Figura 14. Cromatograma de la mezcla comercial Novozym 960, con gradiente segmentado de 12%, 19%, 30% y 100% de una solución de NaCl 1M, con un flujo de 1ml/min..... | 41 |
| Figura 15. Cromatoplaqa de la reacción de inulina de agave al 0.5% con la fracción obtenida por FPLC (30% de solución de NaCl) a los diferentes tiempos expresados en minutos. | 42 |
| Figura 16. Cromatoplaqa de la reacción fracciones extracelulares con inulina de agave al 1%. De izquierda a derecha se observa estándar de inulina al 1%, de fructosa al 1%, AZ8 extracelular, IS03 extracelular, AZ8 extracelular liofilizado e IS03 extracelular liofilizado..... | 43 |
| Figura 17. Cromatoplaqa de la reacción fracciones intracelulares con inulina de agave al 1%. De izquierda a derecha se observa estándar de inulina al 1% tratada con las condiciones de reacción, AZ8 intracelular e IS03 intracelular..... | 44 |
| Figura 18 Cromatograma de IS03 extracelular liofilizado con un flujo de 1ml/min. | 45 |
| Figura 19 Cromatograma de AZ-8 extracelular liofilizado con un flujo de 1ml/min. | 46 |
| Figura 20. Cromatograma de IS03 intracelular con un flujo de 1ml/min. | 47 |
| Figura 21. Cromatoplaqa de IS03 intracelular de las fracciones 19-22, 13-17, 2 y 1 en reacción con inulina de agave al 1% a las 24 hrs..... | 48 |
| Figura 22. Cromatograma de AZ-8 intracelular | 49 |
| Figura 23. Cromatoplaqa de AZ8 intracelular de las fracciones 19-21, 15-17, 13-14, 2 y 1 en reacción con inulina de agave al 1% a las 24 hrs. | 49 |
| Figura 24. Cromatograma de la reacción de la fracción IS03 intracelular 13-16 en un medio con inulina de agave al 1%. | 55 |
| Figura 25. Cromatograma de la reacción de la fracción IS03 intracelular 19-22 en un medio con inulina de agave al 1%. | 55 |
| Figura 26. Cromatograma de la reacción de la fracción AZ8 intracelular 15-18 en un medio con inulina de agave al 1%. | 56 |
| Figura 27. Gel de poliacrilamida proteína intracelular. De izquierda a derecha se observa a la cepa IS03 en el carril 4, AZ8 en el carril 3, y al final del gel los marcadores de masa molecular. | 58 |

ÍNDICE DE GRÁFICAS

| | |
|--|----|
| Gráfica 1 Determinación de la actividad de la proteína precipitada a 65% de saturación, reaccionando con inulina de achicoria al 0.5% a pH5.5 temperatura 50°C; a los 30 min 24 hrs..... | 32 |
| Gráfica 2. Determinación de la actividad de proteína precipitada a 80% de saturación, reaccionando con inulina de achicoria al 0.5% a pH5.5 temperatura 50°C, a los 30 min 24 hrs..... | 33 |
| Gráfica 3. Determinación de la actividad de proteína precipitada a 95% de saturación con inulina de achicoria al 0.5% a pH5.5 temperatura 50°C; a los 30 min 24 hrs..... | 35 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Microorganismos empleados en la producción de inulinasas. (Pandey <i>et al.</i> , 1999) | 11 |
| Tabla 2 Rendimiento de la producción enzimática de <i>Kluyveromyces marxianus</i> (Castillo-Chamy, 2010)..... | 15 |
| Tabla 3. Contenido de proteína, actividad enzimática medida a los 30 min de reacción y actividad específica de las diferentes fracciones de los 3 precipitados de Novozym 960 | 36 |
| Tabla 4. Concentración de proteína de las diferentes fracciones de las cepas IS03 y AZ8..... | 52 |

RESUMEN

La inulina es un biopolímero que puede ser usado para la producción de fructosa y sus derivados, como los inulooligosacáridos (IOS). Las inulinas de achicoria y de alcachofa de Jerusalén son hasta ahora las fuentes industriales más importantes de inulooligosacáridos. Existen otros tipos de inulina como la proveniente del Agave (*A. tequilana*, *A. angustifolia*, *A. potatorum*, *A. salmiana*) y se le conoce como agavina. Esta planta contiene hasta un 25% de fructanos como la inulina que es estructuralmente distinta a la de achicoria (Bautista- Justo M, 2001). Su diferencia radica en un mayor grado de ramificación respecto a la inulina de achicoria. Dependiendo del tipo de enlace que contengan se pueden clasificar como inulinas si predominan los enlaces β -(2,1), o como levanas cuando los enlaces predominantes son β -(2,6).

Las enzimas que hidrolizan los enlaces β -(2,1) de la inulina a fructosa y glucosa e IOS se conocen como inulinasas y se clasifican dentro del grupo de las hidrolasas. Las inulinasas se clasifican en endo-inulinasas que hidrolizan los enlaces internos de la inulina para producir principalmente inulotriosa, inulotetraosa, e inulopentaosa; y en exo-inulinasas que hidrolizan el extremo no reductor de la inulina, produciendo principalmente fructosa.

El presente trabajo de investigación consistió en el aislamiento y purificación de enzimas exo y endo inulinasas provenientes de microorganismos previamente aislados de bagazos de agave. Estos microorganismos usan la inulina de agave como única fuente de carbono. Como control positivo y para establecer una metodología de purificación, se separaron a las enzimas endo y exo inulinasas de la mezcla comercial Novozym 960 y se midió su actividad tanto con inulina de achicoria, como de agave (agavina).

Posteriormente se cultivaron 2 cepas previamente seleccionadas y caracterizadas, ambas cepas se identificaron como *Kluyveromyces marxianus*, y se nombraron como IS03 y AZ8. Para la extracción de las enzimas, estas se trabajaron en 2

fracciones, extracelular e intracelular, se manejaron dos metodologías para la concentración de proteína. Las enzimas se aislaron y purificaron por medio de cromatografía líquida rápida de proteína (FPLC por sus siglas en inglés), integrando la técnica de intercambio aniónico, colectando así fracciones proteicas. Se evaluó la actividad enzimática de dichas fracciones con inulina de agave por cromatografía de capa fina y una cuantificación de proteína por el método de Bradford.

La evaluación de la hidrólisis y de los productos generados se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés). Se encontró que la fracción intracelular de la cepa AZ8 presentó mayor producción de IOS, mientras que la fracción intracelular de cepa IS03 tuvo mayor producción de proteína. Cabe señalar que aunque las dos cepas provienen de *Kluyveromyces marxianus*, la cepa AZ8 presentó mejores resultados para la producción de inulinasas.

1. ANTECEDENTES

1.1. Agave

Los agaves pertenecen a la familia Agavaceae, que es endémica de América (García Mendoza, 1995). Su distribución es tropical y subtropical, frecuentemente presentes en zonas de clima árido. La gran variedad y sus múltiples usos han jugado un importante papel en la identificación cultural del país (Lappe Oliveras et al., 2008). Los agaves comprenden más de 200 especies, de las cuales aproximadamente tres cuartas partes se encuentran en México, área considerada como el centro de origen del género.

En la actualidad, las agaváceas representan un grupo de plantas con gran importancia biológica, ecológica y económica del país, dado que muchas especies son utilizadas como alimento, en obtención de fibras para cordelería y textiles, como plantas ornamentales y principalmente en la producción de bebidas alcohólicas destiladas y no-destiladas como lo son el tequila, el mezcal y el pulque. La mayoría de los procesos de producción de estas bebidas mexicanas involucran una fermentación compleja donde bacterias (principalmente lácticas y ácido acéticas) y levaduras (*Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*) están presentes en poblaciones mixtas estables, o se suceden unas a otras, y tienen un importante impacto sobre las propiedades sensoriales y nutritivas del producto final (Lappe Oliveras et al., 2008).

En las agaváceas existen diferencias interesantes en la estructura de sus fructanos, por ejemplo, en el *Agave americana* se ha reportado la presencia mayoritaria de fructanos del tipo de inulina líneal, mientras que en *Agave veracruz* los fructanos predominantes son de tipo levana, sin embargo, estudios recientes demuestran que en el *Agave tequilana*, los fructanos no son inulina líneal, más bien una mezcla de inulinas y levanas ramificadas. Dichas variedades estructurales pueden ser, en buena parte, responsables de las diferencias que caracterizan a las bebidas que de ellas se derivan (Olvera et al, 2007).

1.2. Fructanos

Los fructanos son polímeros de fructosa derivados de la molécula de sacarosa, la cual es un disacárido de fructosa y glucosa. Los fructanos de plantas tienen diferentes estructuras y longitudes de cadena, que van de arriba de tres a pocos cientos de unidades de fructosa, con una gran variedad en enlaces y residuos fructosilo. Los fructanos con un grado de polimerización de 2 a 10 son comúnmente llamados fructooligosacáridos. Los fructanos que son sintetizados en la naturaleza son solubles en agua y son azúcares no reductores. Estos compuestos de distinto origen pueden diferir en el grado de polimerización, la presencia de ramificaciones, el tipo de enlace entre las unidades de fructosa adyacentes y la posición de los residuos de glucosa. 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) (Figura 1). 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 neoserias de inulina, que además contiene una unidad de glucosa entre dos unidades de fructosa, y β -(2,1) para las neoserias de levanas. En los fructanos ramificados los enlaces que generan ramificación son usualmente β -(2,6) (Muñoz-Gutierrez et al, 2009; López et al, 2012).

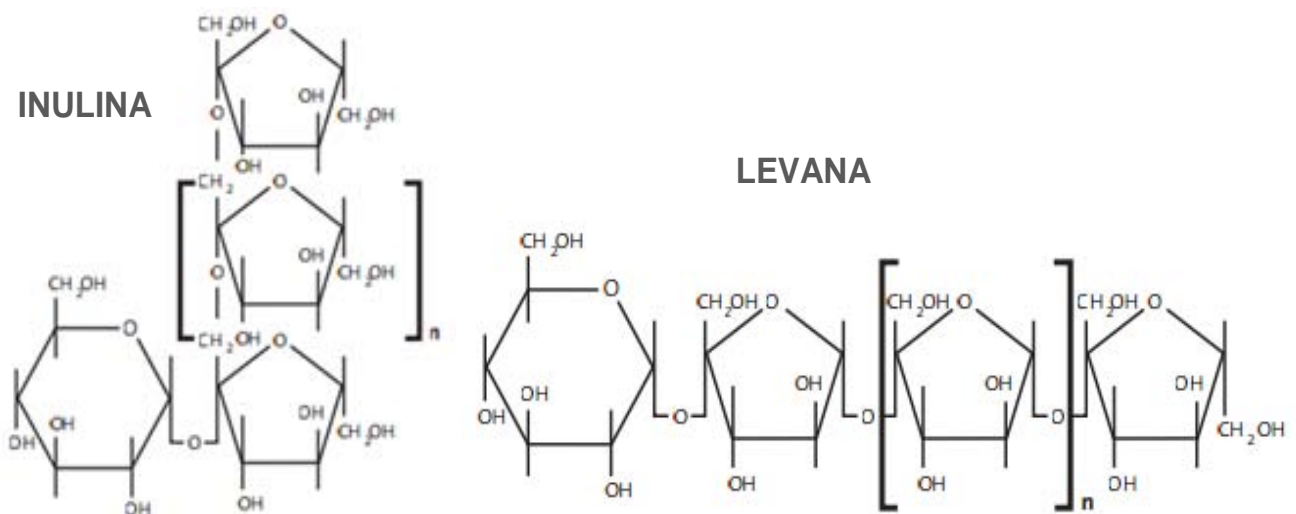


Figura 1. Estructuras de los fructanos de inulina y levana (Olvera et al, 2007)

Los fructanos se encuentran en un amplio espectro de bacterias de diferentes fisiologías, en un número limitado de hongos y en aproximadamente el 15 % de especies de plantas de floración pertenecientes a las familias monocotiledóneas y dicotiledóneas, especialmente de climas templados y áridos.

Ciertas bacterias Gram positivas y Gram negativas producen levanas, mientras que la síntesis de inulina sólo se ha reportado en especies Gram positivas como *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus reuteri* y *Leuconostoc citreum*. La levana e inulina producidas por bacterias, son los fructanos más largos de la naturaleza, con un grado de polimerización de 10^4 a 10^6 . Las especies de hongos que producen fructanos están incluidas básicamente en los géneros *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, y *Phytophthora*. Los fructanos sintetizados por hongos consisten en una cadena lineal, cuyo tamaño puede variar entre especies en el mismo género. Por ejemplo, *Aspergillus sydowi* convierte sacarosa en inulina con un grado de polimerización de arriba de 30, mientras que *Aspergillus niger*, *Aspergillus phoenix*, *Aspergillus foetidus* y *Aspergillus oryzae* producen cadenas que contienen de 3 a 8 unidades de monosacáridos (Ulloa *et al*, 2010).

La inulina almacenada en raíz de achicoria (*Chicorium intybus*) y en tubérculos como la alcachofa (*Helianthus tuberosus*) tienen un promedio de grado de polimerización más bajo, aproximadamente de 10 a 30. El grado de polimerización más alto de inulina en la familia *Asteraceae* ha sido encontrado en alcachofa globo (*Cynara scolymus*) llegando arriba de 200 residuos de fructosa. Las plantas monocotiledóneas (las familias *Poaceae*, *Alliaceae*, *Asparagaceae*, *Agavaceae*, *Amaryllidaceae*, *Haemodoraceae* e *Iridaceae*) producen fructanos más complejos.

Los pastos (*Poaceae*) forman estructuras que varían de la levana lineal, referida como fleína, a una levana muy ramificada, por ejemplo en trigo (*Triticum aestivum*) y en cebada (*Hordeum vulgare*). Los miembros de *Alliaceae* y *Asparagaceae*, por ejemplo, la cebolla (*Allium cepa*) y espárragos (*Asparagus officinalis*) producen neoseries de inulina. En *Agavaceae* se han encontrado diversas estructuras de

fructanos. En *Agave americana*, la inulina fue identificada como principal carbohidrato de reserva. Los tallos de *Agave veracruz* y de *Agave tequilana* almacenan una mezcla compleja de fructooligosacáridos, inulinas, neoserias de inulinas y fructanos ramificados (Ulloa J *et. al*, 2010).

A los fructanos se les han asociado una serie de funciones en pro de la salud, dentro de las cuales destacan su efecto benéfico como prebiótico, en la disponibilidad de minerales, el fortalecimiento de los mecanismos de defensa, el mejoramiento del metabolismo de lípidos, así como la prevención de ciertas enfermedades.

Efecto prebiótico. Los prebióticos son componentes alimentarios no digeribles que benefician a la salud del huésped por estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de bacterias del colon, anulando el crecimiento de bacterias patógenas. Dentro de las bacterias que son promovidas por la presencia de fructanos en el colon se encuentran las identificadas como bifidobacterias o probióticos, las cuales realizan la fermentación de tales materiales. Durante el proceso de fermentación de ciertos fructanos del tipo oligofructosa o inulina se forman ácidos grasos de cadena corta y ácido láctico. Los ácidos grasos de cadena corta estimulan el crecimiento de las células de la mucosa colorrectal, retarda la atrofia de la mucosa y disminuye el riesgo de transformación maligna del colon (Ulloa et al, 2010; Roberfroid, 2001).

Disponibilidad de minerales. El consumo de fructanos ha demostrado mejorar la absorción de minerales tales como el calcio, magnesio, zinc, hierro y cobre, esto a su vez tiene una consecuencia benéfica en la salud de los huesos, especialmente en lo relativo a su mineralización, densidad y reabsorción (Ulloa et al, 2010; Tokunaga, 2004).

Mecanismos de defensa. Los fructanos afectan benéficamente una serie de funciones gastrointestinales, gracias a la modulación de su estructura, de la composición y de varias actividades de la mucosa y de la microbiota. Se sabe también que afectan el epitelio intestinal mejorando la morfología de su mucosa, la

composición de las mucinas, así como la resistencia a la colonización y las funciones químicas y enzimáticas del tracto gastrointestinal, reduciendo el riesgo de enfermedades relacionadas a la disfunción de la defensa gastrointestinal, así como lesiones intestinales ulcerativas (Ulloa et al, 2010; Cherbut, 2002).

Metabolismo de lípidos. Diversos estudios apuntan que los fructanos ejercen acciones fisiológicas a nivel sistémico, relacionadas con efectos sobre el metabolismo de lípidos, particularmente a través de la disminución de la trigliceridemia y colesterolemia (Delzenne et al, 2002).

Prevención de enfermedades. Las principales enfermedades que se previenen por los fructanos tipo inulinas son: a) mitigación de estreñimiento, mejorando la formación del bolo fecal y favoreciendo la movilidad del intestino, b) supresión de diarreas, especialmente las asociadas a infecciones intestinales, c) reducción del riesgo de osteoporosis, d) reducción de riesgo a la arterosclerosis cardiovascular asociada a dislipidemias, especialmente a hipertrigliceridemia y a la resistencia de insulina, e) reducción de riesgo a la obesidad y a la posibilidad de contraer diabetes tipo 2, ambas enfermedades asociadas a la resistencia de insulina, f) síndrome del intestino irritable, g) cáncer de colon inducido químicamente, h) constipación, gracias al incremento en la producción de ácidos grasos de cadena corta. (Ulloa J et al, 2010; Tokunaga, 2004).

1.3. Inulina y fructooligosacáridos

La inulina es un polímero de fructosa unido por enlaces β -(2-1) unidos a una glucosa terminal por su carbono 1. Se presenta como una mezcla de polisacáridos con distintos grados de polimerización que varían típicamente entre 20 y 30 unidades de fructosa; sin embargo, y en su forma nativa encontramos una mezcla de oligosacáridos y polisacáridos entre 2 y 60 unidades de fructosa (Muñoz-Gutierrez, 2009; López, 2003).

La longitud de las cadenas varían entre cada planta y de acuerdo con la estación del año, por lo cual diferentes grados de polimerización están presentes en los

fructanos de la misma planta. Debido a esta variación en la longitud de estas cadenas su peso molecular varía entre $\pm 3500 - 5000$ Da. Se encuentra en órganos internos de muchas plantas como carbohidrato de reserva, entre las que se encuentran las raíces de diente de león (*Taraxacum officinale*) y de achicoria (*Chichorium intibus*), los tubérculos de la alcachofa de Jerusalén (*Helianthus tuberosus*) y de dalia (*Dahlia pinnata*) los bulbos de iris (*Iris* sp.) y las piñas de los agaves. No es tóxica, se disuelve fácilmente en agua caliente y una solución de alta concentración de inulina tiene baja viscosidad (Vandame, 1983; Nakamura, 1994; Pandey, 1999; Bautista, 2001; González, 2007; Kang, 2008; Chi, et al, 2009).

Las inulinas de achicoria y de alcachofa de Jerusalem son hasta ahora las fuentes industriales más importantes de inulinooligosacáridos (IOS), mientras que la inulina del Agave (*A. tequilana*, *A. angustifolia*, *A. potatorum*, *A. salmiana*) es una fuente de carbono para la fermentación de bebidas alcohólicas tradicionales como Tequila, Mezcal, Bacanora y Sotol (López, 2003). En México, hasta el 2007 se contaban con un exceso de plantas sembradas en todo el país. Particularmente en los Estados de Guanajuato, Michoacán, Nayarit, Tamaulipas y Jalisco, siendo este último el mayor productor (Consejo Regulador del Tequila, 2011). 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. La inulina de agave, a diferencia de la proveniente de otras especies como la achicoria, es un polímero altamente ramificado con estructura que combina residuos de fructosa unidos por enlaces β -(2,1) y β -(2,6), con la presencia de residuos de glucosa dentro y fuera de la cadena (Figura 2) (Mancilla-Margalli, 2006). Este tipo de inulina posee un grado de polimerización de 3 a 29 unidades.

Los oligofructanos 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 la inulina de agave ha llevado a renombrarla como agavina (Mancilla-Margalli, 2006).

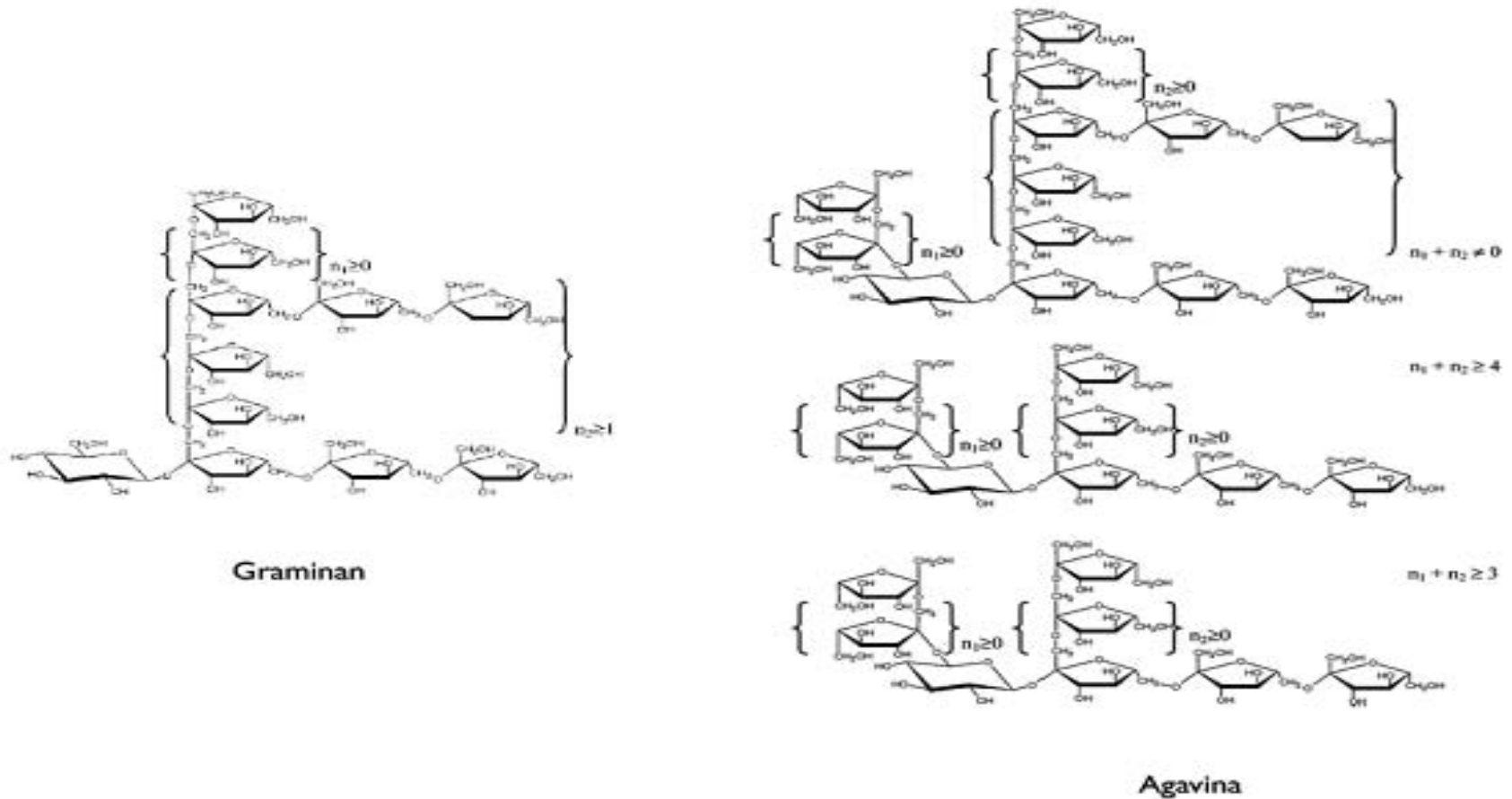


Figura 2. Estructuras propuestas de los fructanos para inulina de agave (agavina) y graminan. Las dos últimas se encuentran en *Agave* spp. (Mancilla et al; 2006), (Muñoz-Gutiérrez et al; 2009).

Los inulooligosacáridos (IOS) producidos a partir de la inulina tienen estructuras químicas y funcionalidades fisiológicas similares a las de los fructooligosacáridos (FOS) (Farnworth et al, 1993; Kaur - Gupta, 2002). La producción de inulooligosacáridos (IOS) ha sido estudiada 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. En una amplia variedad de productos alimenticios se usa la inulina y sus derivados como: espesante, emulsificante, gelificante, sustituto de azúcares y de grasas, humectante, depresor del punto de congelación. También se emplean en la industria química-farmacéutica y de procesamiento como excipiente, aditivo, agente tecnológico o coadyudante; en la industria de la alimentación animal, y se está considerando su uso como constituyente de los empaques por su carácter de material bioactivo. Los IOS son de una a tres veces más dulces que la sacarosa, no son cariogénicos y no son utilizados como fuente de energía (Chacón, 2006)

1.4. Inulinasas

La inulinasa o β -(1,2) fructan-fructanohidrolasa es la enzima responsable de hidrolizar los enlaces β -(1,2) de la inulina. La inulinasa puede obtenerse de dos orígenes diferentes: origen vegetal y origen microbiano. La achicoria y la alcachofa de Jerusalem han demostrado contener inulinasas que pueden ser extraídas y purificadas, aunque de acuerdo con Kochhar et al., (1999) estas fuentes vegetales no son tan productivas como las fuentes microbianas, que parecen ser las únicas capaces de producir una cantidad suficiente de enzima para cubrir las necesidades industriales (Rica et. al., 2007). Los microorganismos son las mejores fuentes para la producción comercial de inulinasas debido a que son de fácil cultivo y a los altos rendimientos de enzima obtenidos.

Diversas investigaciones revisadas por Chi et al. (2009) han confirmado que cepas de levaduras arrojan mejores rendimientos de actividad enzimática que cepas de hongos o bacterias. Las diferencias entre las enzimas producidas por distintos microorganismos son el rendimiento de enzima obtenido (unidades de actividad

enzimática/ml de caldo de cultivo) y las propiedades de la enzima que estrictamente dependen no solo del microorganismo, también de la manera en que es realizada la fermentación (Ricca *et al.*, 2007). Una lista más extensa de los microorganismos que se han empleado para la producción de inulinasas y de los rendimientos de producción obtenidos se reporta en la Tabla 1.

Tabla 1. Microorganismos empleados en la producción de inulinasas. (Pandey *et al.*, 1999)

| Microorganismo | Rendimiento (U/ml) |
|---|--------------------|
| HONGOS | |
| <i>Aspergillus sp.</i> | 75 |
| <i>A. aureus</i> MTCC 151 | 160 |
| <i>A. ficuum</i> | 3000* |
| <i>A. fischeri</i> MTCC 150 | 1-1.2 |
| <i>A. flavus</i> MTCC 277 | 1-1.2 |
| <i>A. nidulans</i> MTCC 344 | 1-1.2 |
| <i>A. niger</i> 817 | 0.0685 |
| <i>A. niger</i> A42 | 4600* |
| <i>A. niger</i> MTCC 281 | 1-1.2 |
| <i>A. niger</i> mutant 817 | 160 |
| <i>A. niger</i> mutant UV1 | 120 |
| <i>Cladosporium sp.</i> | 10.9 |
| <i>Fusarium sp.</i> | 0.080 |
| <i>Penicillium sp.</i> | 50 |
| <i>Penicillium sp.</i> 91-4 | 3.74 |
| <i>P. rugulosum</i> | 54 |
| <i>P. trzebinskii</i> | 11 |
| <i>Streptomyces sp.</i> | 32 |
| <i>S. rochei</i> E87 | 1 |
| Bacterias | |
| <i>Bacillus sp.</i> | 5.14 |
| <i>B. subtilis</i> 430 A | 50-70 |
| <i>Clostridium acetobutylicum</i> IFP 912 | 43.7 |
| <i>C. acetobutylicum</i> ABKn8 | 6.06 |
| <i>C. thermosuccinogenes</i> | 0.011 |
| <i>Flavobacterium molivorum</i> | 0.456 |
| <i>Pseudomonas sp.</i> 65 | 15 |

| | |
|--|--------|
| <i>Staphylococcus sp.</i> | 0.634 |
| Levaduras | |
| <i>C. pseudotropicalis</i> IP513 | 25000* |
| <i>Kluyveromyces fragilis</i> | 7 |
| <i>K. fragilis</i> ATCC 12424 | 355 |
| <i>K. lactis</i> | 43.7 |
| <i>K. marxianus</i> | 56000* |
| <i>K. marxianus</i> ATCC 36907 | 260 |
| <i>K. marxianus</i> ATCC 52466 | 0.418 |
| <i>K. marxianus</i> CDBB-L-278 | 82 |
| <i>K. marxianus</i> var. <i>marxianus</i> CBS 6556 | 3000 |
| <i>K. marxianus</i> CBS 6556 | 58000* |
| <i>K. marxianus</i> UCD (FST) 55-82 | 212 |

* U/g

La clasificación de las inulinasas se basa en la existencia de dos posibles efectos de estas enzimas sobre los enlaces de la molécula de inulina, pudiendo producir cadenas cortas de oligofructanos o fructosa. De esta forma, se reconocen dos tipos de inulinasas: las exo-inulinasas (β -D-fructan fructanohidrolasa, E.C. 3.2.1.80) y las endo-inulinasas (2,1- β -D-fructan fructanohidrolasa, E.C. 3.2.1.7) (Vijayaraghavan, 2009). La acción de las exo-inulinasas sobre la molécula de inulina comienza con la separación de la primera molécula de la D-fructosa del extremo no reductor y continúa una por una hasta el rompimiento del último enlace liberando una molécula de D-glucosa; como resultado obtenemos moléculas libres de D-fructosa y una molécula de D-glucosa por cada molécula de inulina. Por otro lado, las endo-inulinasas actúan haciendo cortes en la estructura interna de la molécula de inulina, produciendo cadenas cortas de oligofructanos e inulosacáridos (Chi et al., 2009; Ricca et al., 2007). La propiedad de ser endo u exo enzima depende de la fuente microbiana a través de la cual fue producida (Pandey et al., 1999) y la propiedad de ser una enzima extracelular o intracelular parece estar determinada por el tipo de microorganismo productor y del sustrato empleado para realizar la fermentación (Ricca et al., 2007). Existen diferencias en las propiedades moleculares entre las exo-inulinasas y las endo-inulinasas, estas se pueden observar en el peso molecular que presentan, siendo de

aproximadamente 74 kDa para exo y 64 kDa para endo-inulinasa, sin embargo no se han observado grandes diferencias en cuanto a los intervalos de estabilidad a pH y temperatura (Ricca et al., 2007).

Las inulinasas de levaduras son enzimas extracelulares parcialmente asociadas a la pared celular y parcialmente excretadas al medio de cultivo; es por esta propiedad que las inulinasas en levaduras pueden presentarse como enzimas extracelulares y como enzimas intracelulares (Pandey et al., 1999). Dos glicoproteínas extracelulares son conocidas por estar asociadas con la producción de invertasa en *S. cerevisiae* e inulinasa en *K. marxianus*. Estas enzimas mostraron actividad hidrolítica sobre la sacarosa, pero difirieron en la especificidad que presentaron hacia oligosacáridos y fructanos de alto peso molecular, como la inulina. Una investigación en la síntesis de inulinasa en levaduras demostró que la enzima es inducible y está sujeta a represión catabólica (Vijayaraghavan et al., 2009). La inulinasa de microorganismos terrestres presenta una actividad máxima a temperaturas por debajo de los 50°C, mientras que su temperatura óptima es comúnmente entre 30°C y 55°C. El pH óptimo de la enzima se encuentra entre 4.5 y 6.

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, 2002). Kaur y colaboradores reportaron un peso molecular para la inulinasa de *Kluyveromyces fragilis* 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). A continuación se muestran 2 representaciones de las estructuras de inulinasas, una perteneciente a la endo-inulinasa de *Aspergillus ficuum* capaz de disgregar los enlaces β -(2,1) y β -(2,6) y la otra exo-inulinasa perteneciente a *Aspergillus awamori*, actuando sobre enlaces β -(2,1) (Figura 3).

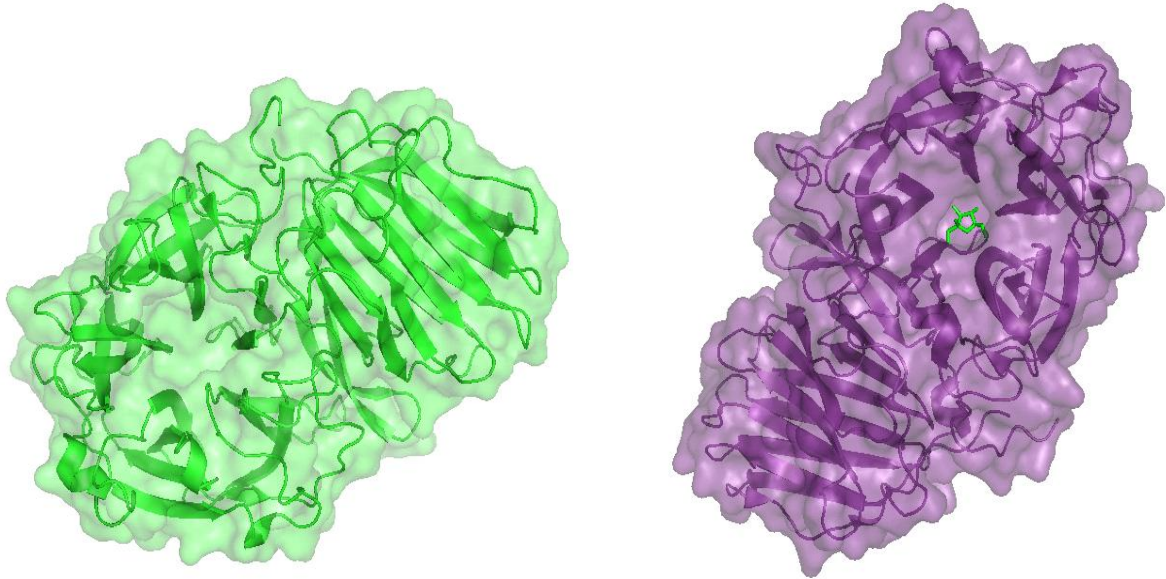


Figura 3 Representación la endo y exo inulinasa. Izquierda endoinulinasa de *Aspergillus ficuum*, derecha exoinulinasa de *Aspergillus awamori* mostrando la fructosa (verde) en el sitio activo. (3SC7 y 1Y9G del PDB)

1.4.1. *Kluyveromyces* como productoras de inulinasa

Dentro de los microorganismos más empleados en la producción de inulinasas se encuentra el género *Kluyveromyces*, que es bien conocido por su capacidad de crecer utilizando fructanos como fuente de carbono. *Kluyveromyces marxianus* es una especie de levadura que corresponde a la forma sexual de *Candida kefyr*, es una levadura aerobia. Sin embargo se ha reportado su participación en algunas fermentaciones, como la del agave mezcalero. Esta especie ha demostrado tener una excelente capacidad de producción de inulinasa. De acuerdo a un reporte, la exoinulinasa producida por *K. marxianus* presenta un peso molecular de 72 kDa, un pH óptimo de 4.4, temperatura óptima de 55°C. Algunos rendimientos de producción de la enzima inulinasa utilizando *K. marxianus* como microorganismo productor se presentan en la Tabla 2. Cabe señalar que las enzimas provenientes de esta especie se han caracterizado únicamente con inulina lineal, preferentemente con inulina de achicoria.

Tabla 2 Rendimiento de la producción enzimática de *Kluyveromyces marxianus* (Castillo-Chamy, 2010)

| Microorganismo | Tipo de cultivo | Rendimiento U/ml | Referencia |
|---|------------------------|-------------------------|------------------------------------|
| <i>Kluyveromyces</i> sp Y-85 | Líquido | 59.5 | Wei <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>K. marxianus</i> | Líquido | 43.7 | Pandey <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>K. marxianus</i> ATCC36907 | Líquido | 260 | Pandey <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>K. marxianus</i> ATCC52466 | Líquido | 0.418 | Pandey <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>K. marxianus</i> CDBB-L-278 | Líquido | 82 | Cruz-Guerrero <i>et al.</i> , 1995 |
| <i>K. marxianus</i> var. <i>marxianus</i> CBS6556 | Líquido | 3000 | Pandey <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>K. marxianus</i> UCD(FST)55-82 | Líquido | 212 | Pandey <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> | Continuo | 107 | Kushi <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>K. marxianus</i> ATCC 16045 | Líquido | 121 | Silva-Santistebany Filho, 2005 |
| <i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> | Líquido | 4.1 | Cazzeta <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>K. marxianus</i> (A1 Y A2) | Líquido | 32 | Cruz-Guerrero <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571 | Sólido | 391.9 U/g | Bender <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571 | Líquido | 8.87 U/g.h | Mazutti <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>K. marxianus</i> S120 | Sólido | 409.8 U/g | Chen <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>K. marxianus</i> YS-1 | Líquido | 50.2 | Singh y Bhermi, 2008 |
| NRRL Y-7571 | Sólido | 463 U/g | Mazutti <i>et al.</i> , 2010 |

En una investigación en donde se ha utilizado levaduras de mostos de aguamiel y pulque para producir inulinasa, se encontró que las cepas de *Kluyveromyces marxianus* (A1 y A2), aislada de aguamiel y *K. lactis* var. *Lactis* (P7) aislada de pulque, mostraron una mayor producción de inulinasa y baja susceptibilidad a la represión catabólica comparadas con *K. marxianus* CDBB-L-278, probablemente porque la fuente de donde se aislaron es rica en sacarosa y oligofruktosa. Estas dos cepas mostraron una producción de inulinasa menor a 32 U/ml en el medio líquido empleado, que contenía diferentes concentraciones de inulina (Cruz-Guerrero et al, 2006).

Chi (Chi et al., 2009) resalta el hecho de que las levaduras, principalmente del género *Kluyveromyces*, produzcan inulinasas principalmente del tipo exo-enzimas. En este mismo artículo se concentra el resultado de muchas investigaciones sobre el efecto activador/inhibidor que presentan algunos iones metálicos sobre las inulinasas producidas principalmente por el género *Kluyveromyces*, mostrando que por lo general Ca^{2+} y Fe^{2+} suelen tener un efecto de activación, mientras que Cu^{2+} y Ag^{+} generan un efecto de inhibición. En cuanto a los pesos moleculares

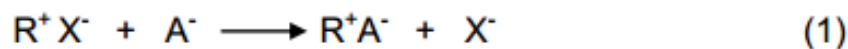
presentados por las inulinasas de hongos y levaduras, se señala que la mayoría presentan un peso molecular que oscila entre los 55 y 70 kDa, con excepción de una cepa de *Kluyveromyces fragilis* que de acuerdo a lo reportado por Gupta et al. (1994) presentó un peso molecular de 250kDa.

1.5. Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico es una técnica similar a la cromatografía de líquidos de alta resolución, la cual está orientada a la separación de iones y compuestos polares, basándose en las diferencias de sus cargas superficiales y accesibles (Rouessac, Rouessac, 2003). El fundamento de la técnica es la atracción iónica que primeramente establece la fase estacionaria (retención) y después la fase móvil (elución) sobre los solutos de naturaleza iónica con carga (Figura. 4). Cuanto más grande sea la carga que posea un ión, más retenido estará por la fase estacionaria. Es preciso que la fase estacionaria posea iones de carga contraria a los iones que se quieren separar. Existen dos tipos de cromatografía de intercambio iónico:

- Cromatografía de intercambio aniónico.
- Cromatografía de intercambio catiónico.

En la cromatografía de intercambio aniónico los solutos son aniones y la fase estacionaria posee grupos catiónicos capaces de retener los aniones, neutralizados por el contra anión de carga negativa, aniónico (Rouessac, Rouessac, 2003.). El ion de interés se une a la fase estacionaria, sustituyendo al contraión aniónico, como se muestra en la ecuación 1.



En donde R es el intercambiador iónico, X es el contraión de la fase móvil y A- el analito aniónico.

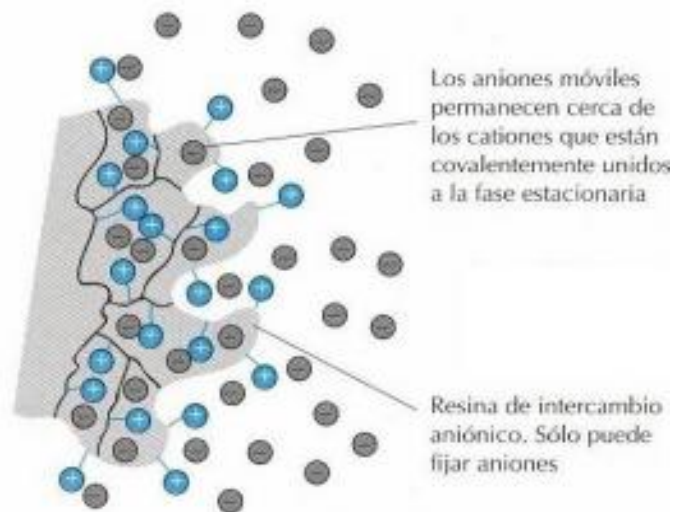


Figura 4 Interacción de la fase estacionaria en cromatografía de intercambio iónico

Las operaciones de intercambio iónico son básicamente reacciones químicas de sustitución entre un electrolito en solución y un electrolito insoluble con el cual se pone en contacto con la solución. Los mecanismos de estas reacciones son tan parecidos a las operaciones de adsorción que se considera como un tipo especial de adsorción (Zahida K, 2008). La eficiencia del proceso depende del equilibrio sólido-fluido y la velocidad de transferencia de materia. Los sólidos suelen ser de tipo polimérico, siendo los más habituales los basados en resinas sintéticas.

Este tipo de cromatografía utiliza como soportes a la sílice o a resinas en donde se enlaza por reacciones específicas de polimerización en el intercambiador para formar así a la fase estacionaria. Una resina de intercambio iónico puede considerarse como una estructura de cadenas hidrocarbonada a las que se encuentran unidos de forma rígida grupos iónicos libres. Estas cadenas se encuentran unidas transversalmente formando una matriz tridimensional que proporciona rigidez a la resina y donde el grado de reticulación o entrecruzamiento determina la estructura porosa interna de la misma. Como los iones deben difundirse en el interior de la resina para que ocurra el intercambio, la selección del

grado de reticulación puede limitar la movilidad de los iones participantes (Skoog D, 2001).

1.6. Electroforesis

La electroforesis es una técnica indispensable en una amplia gama de biociencias, particularmente en estudios sobre proteínas y ácidos nucleicos. La electroforesis es el movimiento de moléculas cargadas negativa o positivamente a través de un campo eléctrico. La velocidad de movimiento de cualquier molécula está dada por la relación de la fuerza del campo eléctrico entre el coeficiente de fricción de la molécula. El coeficiente de fricción de la molécula f depende del tamaño y forma de la molécula.

La electroforesis zonal (o de bandas) es la forma más simple de una separación electroforética; en ésta, un pequeño volumen de la muestra es colocado en el gel o película soporte, y en presencia de un campo eléctrico los componentes de la muestra son transportadas con una movilidad específica produciendo bandas que están separadas en menor o mayor grado una de la otra.

La electroforesis en gel es una técnica más versátil y preferible que la electroforesis en papel o en acetato de celulosa; fue inicialmente desarrollada usando almidón como soporte, pero actualmente la agarosa y la poliacrilamida son los medios de soporte más empleados. En ambos polímeros el grado de reticulación de la matriz, y por lo tanto el tamaño de los poros del gel, puede variarse de acuerdo con el rango de tamaño requerido para el fraccionamiento de las macromoléculas (Pingoud, 2002).

1.6.1. Gel de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización de monómeros de acrilamida con N,N'-metilen-bisacrilamida. La polimerización de acrilamida con bisacrilamida es iniciada con persulfato de amonio $((\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8)$ que genera fácilmente radicales libres; el catalizador empleado es la N,N,N',N'-

tetrametilendiamina (TEMED). La concentración inicial de acrilamida determina el largo de las cadenas de poliacrilamida que se formarán, y la bisacrilamida el grado de reticulación que se obtendrá. Ambos parámetros determinan las propiedades del gel, particularmente el tamaño de poro obtenido, así como la elasticidad y viscosidad del gel.

La electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) puede realizarse utilizando geles tubulares o laminares, sin embargo el uso de geles tubulares es actualmente más utilizado para la electroforesis-2D. La electroforesis en gel de poliacrilamida laminar es usualmente realizada con una concentración de poliacrilamida constante, escogida de acuerdo al rango de peso molecular que se requiere según la o las proteínas a evaluar. Concentraciones totales de acrilamida entre 5 y 20% permiten hacer la separación de proteínas con peso molecular entre 15 y 200 kDa. La electroforesis en geles de poliacrilamida en su forma más simple (electroforesis zonal continua) el sistema de buffers empleados es homogéneo. La electroforesis zonal continua no es adecuada para trabajar con muestras diluidas, ya que no se producen bandas concentradas como el caso de la electroforesis zonal discontinua. Una aplicación de este tipo de electroforesis es la determinación del peso molecular de proteínas. Bajo condiciones restrictivas, es decir cuando la porosidad del gel afecta la movilidad de las proteínas, existe una relación lineal entre el logaritmo de la movilidad relativa de una concentración de proteínas, siempre y cuando las condiciones de temperatura, buffer, y proporción de bisacrilamida permanezcan constantes. Bajo esta premisa, es posible comparar la movilidad de una proteína de peso molecular desconocido con la movilidad de una serie de proteínas de estructura similar pero de masa conocida. Aunque esta aplicación es de gran relevancia, la principal aplicación de la electroforesis zonal continua se encuentra en el análisis de ácidos nucleicos.

La electroforesis zonal discontinua es la técnica más frecuentemente utilizada en el análisis de proteínas. El método, originalmente desarrollado por Ornstein y Davis, ha dado lugar a varias técnicas derivadas, en particular a la técnica SDS-PAGE. Los principales avances de la electroforesis zonal discontinua radican en

su alta resolución y sensibilidad. Una de las características principales de esta técnica es la inclusión de un gel de carga o *stacking gel* en la parte superior del gel de separación; el alto poder de resolución del método depende de muchos factores, en particular de la discontinuidad de la estructura del gel (entre el gel de carga y el gel de separación) y los diferentes buffers empleados (buffer de cámara, buffer para gel de separación y buffer para gel de carga). El gel de carga, en donde la muestra se concentra, está compuesto de una baja concentración de poliacrilamida lo que produce un tamaño de poro grande; por lo tanto no se exhibe un efecto de tamizado en este gel por lo que las proteínas se mueven a través de éste independientemente de su tamaño. El gel de separación, compuesto por una concentración mayor de poliacrilamida tiene en consecuencia poros más pequeños y presenta un efecto de tamizado que provoca que la movilidad de las proteínas esté determinada por su tamaño y carga, o en el caso de SDS-PAGE, solo de su tamaño.

La técnica electroforética más utilizada en el análisis de proteínas es la llamada SDS-PAGE. Esta técnica consiste en una electroforesis sobre un gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (0.1%). Esta técnica separa subunidades de proteínas de acuerdo únicamente a su masa molar. El dodecilsulfato de sodio es un detergente aniónico que se une a las proteínas produciendo una alteración en la estructura cuaternaria, estructura terciaria y, en gran medida, la estructura secundaria de las proteínas. Cuando cualquier proteína es sometida a una electroforesis en presencia de SDS existe una relación lineal entre el logaritmo de su masa molar y su movilidad electroforética. Para realizar una determinación de masa molar de una proteína mediante SDS-PAGE es necesario utilizar un marcador de masa molar disponible comercialmente (usualmente entre 10 y 200 kDa.) y que es preparado mediante la mezcla de proteínas de peso molecular conocido (Catsimpoolas, 1976; Pingoud, 2002).

2. JUSTIFICACIÓN

Con la finalidad de aprovechar los agaves no utilizados directamente en la producción del tequila y mezcal, así como las las hojas, desecho de la elaboración del tequila, es necesario encontrar enzimas endo y exo inulinolíticas que hidrolicen inulinas ramificadas para el aprovechamiento integral del agave. Además, la obtención de sistemas enzimáticos capaces de producir fructosa a partir de estos residuos agroindustriales permitirá la generación de compuestos de valor agregado derivados de la fructosa, como los FOS. No obstante, a la fecha no existen reportes de inulinasas capaces de degradar inulinas altamente ramificadas, aunque es claro que estas deben existir ya que este tipo de inulinas se encuentra en distintos vegetales.

El estudio de las funcionalidades de fructooligosacaridos (FOS) es realizado en respuesta a la demanda creciente de consumidores de alimentos sanos y bajos en calorías. Se ha reportado que los FOS 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 FOS son tres veces más 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 regímenes alimenticios controlados, por mencionar algunos.

3. HIPÓTESIS

El aislamiento de microorganismos que utilicen como sustrato agavina como única fuente de carbono, serán capaces de producir endo y exo inulinasas con actividad hidrolítica para dicho compuesto.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

- Obtener enzimas capaces de degradar inulina, utilizando como control positivo una mezcla comercial de exo y endo inulinasas.

4.2. Objetivos particulares

- Establecer una metodología de purificación de enzimas endo y exo inulinasas a partir de una mezcla comercial como control positivo.
- Establecer las condiciones de extracción de las enzimas provenientes de *Kluyveromyces marxianus*.
- Aplicar la metodología establecida para purificar las enzimas endo y exo inulinasas producidas por *K. marxianus*.
- Evaluar la concentración de proteína de las diferentes fracciones obtenidas durante la purificación de las enzimas.
- Identificar los productos de la reacción de hidrólisis de la inulina mediante técnicas de TLC y HPLC.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Purificación de la mezcla comercial de inulinasas Novozym 960 como control positivo de la purificación de enzimas de *K. marxianus*.

5.1.1. Evaluación de la actividad enzimática por análisis de azúcares reductores por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS)

Para la determinación de actividad enzimática de Novozym 960 se prepararon medios de reacción con inulina de achicoria al 0.5% en buffer de acetatos 50 mM a pH 5.5, incubados a 50°C. La reacción se inició con la adición de 0.2 mL de las fracciones de purificación y 1 ml de las fracciones de lavado (inicial y final). Se tomó una muestra de 0.5 mL a los 30 min de reacción y 24 horas. Los productos de la reacción de hidrólisis de inulina de achicoria se determinaron por el método DNS, midiendo azúcares reductores. Al mismo tiempo se elaboró una curva patrón de fructosa con concentraciones conocidas de 1mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, y 5 mg/ml.

En tubos de ensayo con tapa de rosca, se agregaron 500 µl del reactivo de DNS a 200 µl de muestra (medio de reacción), estos se colocaron en un baño maría a 90°C, calentándolos durante 5 minutos. Se detuvo la reacción en un baño con hielo y se mantuvo en reposo durante 15 minutos, para finalizar se agregó 5 ml de agua destilada y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro Perkin Elmer 2 con longitud de onda de 540 nm contra un blanco de reactivos.

5.1.2. Identificación de los productos de hidrólisis por TLC

Se utilizaron cromatoplasmas TLC Silica gel 60 F₂₅₄, marca MERCK, usando como fase móvil una mezcla de Butanol-Metanol-Agua en proporción 3:2:1. Posteriormente las placas fueron eluidas durante aproximadamente 20 minutos cada una y se revelaron con una solución de Orcinol en H₂SO₄ al 5% aplicado con

un aspersor para un recubrimiento uniforme en las placas y se calentó con una parrilla para facilitar la reacción y así el revelado.

5.1.3. Determinación de la concentración de proteína.

La cuantificación de proteína, se realizó por el método de Bradford, para lo cual se elaboró una curva patrón con albúmina bovina sérica de SIGMA con una solución stock con concentración única de 0.1 mg/ml; y se determinó la concentración en los pasos de purificación realizados. Las muestras se hicieron reaccionar con el reactivo de Bradford, después de 5 minutos fueron leídas en un espectrofotómetro Perkin Elmer 2 con longitud de onda de 595nm, frente a un blanco de reactivos.

5.1.4. Precipitación de la proteína por saturación de sal.

Se realizó una separación gruesa de las proteínas mediante la precipitación con sulfato de amonio. En un baño de hielo, la mezcla de proteínas novozym 960, dializada (5.1.5), se precipitó con distintos porcentajes de saturación de sulfato de amonio. Para el primer precipitado se manejo un porcentaje de 65% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 80% para el segundo precipitado y 95% para el tercer precipitado. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min para separar el precipitado del sobrenadante, con el cual se hacia las precipitaciones posteriores, para el precipitado 1 se resuspendió en 7 ml, para el 2 y el 3 se resuspendió en 4 ml.

5.1.5. Diálisis de las fracciones de purificación y mezcla novozyme 960

Se dializaron 50 ml de mezcla comercial Novozyme 960 para retirar el glicerol y para eliminar las sales tanto de cada fracción como de los precipitados de proteína. La membrana se lavó durante 4 horas en agua destilada, posteriormente por 5 min en una solución de H_2SO_4 al 0.2%, seguido de esto se lavó 10 min en agua destilada a 80°C; una vez lista la membrana se prosiguió a llenarla con la muestra, en este caso se dializaron la mezcla comercial Novozym 960 y los 3 precipitados de proteína. Se montaron en un dializador con agitación, con buffer de acetatos 10mM a pH5.5 durante 1 noche a 4°C.

5.1.6. Purificación de endo y exo inulinasas por cromatografía de intercambio aniónico

Una vez dializadas las muestras se introdujeron en una columna de intercambio aniónico. La columna se empaquetó manualmente con 10 mL de bencil celulosa DEAE como matriz de intercambio aniónico, posteriormente se equilibró con 10 volúmenes de buffer de acetatos pH 6.5, 50 mM. En una primera separación se emplearon 7 mL del primer precipitado y 4 mL para el segundo y tercer precipitado, cada muestra se hizo pasar por la columna de manera independiente. Después la columna se lavó con 5 volúmenes del buffer antes descrito, para eliminar las proteínas que no se pegaron a la columna, finalmente la proteína se despegó con fracciones de buffer a distintas molaridades de NaCl (0.2 M, 0.3 M, 0.5 M, 0.7 M y 1.0 M), se pasó 1 volumen de cada fracción las cuales fueron colectadas para su análisis posterior. Se acondicionó la columna haciendo pasar 15 volúmenes de una solución 1M de NaCl para eliminar los restos de proteína de la columna y se pasaron 10 volúmenes de agua para finalizar.

5.2. Extracción y purificación de las enzimas degradadoras de inulina de agave provenientes de *Kluyveromyces marxianus*

5.2.1. Crecimiento microbiano e inducción de inulinasas

Se utilizó un medio enriquecido para el crecimiento de las cepas, con la siguiente composición:

- 0.2% Glucosa
- 0.5% Extracto de Levadura
- 1% Peptona

Las cepas empleadas fueron:

- AZ8 *K. marxianus* aislada del mezcal
- ISO3 *K. marxianus* aislada de bagazo de agave

Se prepararon 500 ml de cultivo para cada cepa, inoculando 2 ml de preinóculo, los medios se incubaron 36 horas a una temperatura de 40°C, para la producción de biomasa, posteriormente se adicionó una solución de 1% de agavina (metlin) para la inducción de la proteínas exo y endo inulinasas, y se dejó a la misma temperatura por 48 horas. Todos los cultivos y las soluciones de inulina fueron esterilizados en autoclave, a 121 °C, a 1 atmósfera de sobrepresión con un tiempo de exposición de 15 minutos.

Previamente a lo antes descrito se preparó un preinóculo con la misma composición del medio de cultivo, ya que las cepas se almacenaron en congelación a -80°C con 50% glicerol como crioprotector, con el fin de mantener células viables. Se utilizó un volumen de 5ml, inoculado con 50 µl, se incubó durante 24 horas a una temperatura de 40°C.

5.2.2. Separación de células del medio de cultivo y ruptura de células

Se centrifugó el cultivo a 5000 rpm durante 15 minutos a 7°C y se separó el pellet del sobrenadante. El sobrenadante se liofilizó, para concentrar la enzima; se verificó que esta no hubiera perdido actividad.

El pellet se lavó con agua desionizada, se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos y se resuspendió para un segundo y tercer lavado, una vez concluido el lavado se resuspendió en buffer de fosfatos 20 mM pH 6.5 con 1 mM de PMSF como inhibidor de proteasa, se le adicionaron perlas de vidrio y se llevó a un disruptor por 5 minutos. Se separó el pellet del sobrenadante por centrifugación a 10000 rpm por 10 min.

5.2.3. Medición de actividad hidrolítica

Se determinó la actividad de la enzima mediante reacciones con agavina en una solución al 1% con buffer acetatos 20 mM pH 5.5, en una incubadora a 50°C. Las muestras enzimáticas analizadas fueron: sobrenadante inicial del cultivo liofilizado (proteína extracelular concentrada) y sin liofilizar (esta solo se evaluó por cromatografía de capa fina); sobrenadante de la ruptura de células (proteína intracelular), fracciones obtenidas de la cromatografía líquida rápida de proteína (FPLC por sus siglas en inglés). Para el estándar de agavina analizado por TLC, se le dio el mismo tratamiento que a las reacciones (buffer acetatos 20 mM pH 5.5 a 50°C).

Estas reacciones fueron analizadas por HPLC y por cromatografía en capa fina.

5.2.4. Cromatografía de intercambio aniónico por FLPC

Se utilizó una columna DEAE sepharose fast flow con un volumen de 1 ml, como fase móvil buffer bis-Tris 20 mM pH 6.5. Se inyectaron muestras de 0.5 ml en un FPLC AKTA Purifier G.E. a un flujo de 1 ml/min.

La columna se equilibró con 5 volúmenes de buffer, posteriormente se inyectó descargando 1 volumen de loop de la fase móvil junto con la muestra, seguido de esto se pasó por la columna 5 volúmenes, en esta etapa se lavaron las proteínas que no se habían quedado en la columna. Al término del primer lavado se generó un gradiente lineal salino con el mismo buffer (bis-Tris 20mM pH 6.5 1M) de 0 a 1M de NaCl, se hicieron pasar 10 volúmenes de columna; en esta etapa se recolectaron las proteínas desprendidas de la columna en un recolector Äkta 900, cada fracción contenía 0.5 ml de fase móvil. Para el análisis de la muestra se utilizó un detector de UV a una longitud de onda de 280nm, para finalizar se lavó la columna con 5 volúmenes del mismo buffer conteniendo 1M de NaCl.

5.2.5. Identificación de los productos de hidrólisis por HPLC

Se empleó una columna aminada Phenomenex Luna 5 μ NH₂, 230x4.6mm, para la detección de los productos de hidrólisis. Se inyectó 10 μ l de cada fracción de purificación y se dejó correr por 30 minutos a un flujo de 1ml/min con un gradiente acetonitrilo agua (80-20). Para los estándares se empleó soluciones de fructosa, glucosa, nistosa, kestosa, fructofuranosilnistosa y agavina a 50 mg/ml. En todas las corridas analizadas se utilizó un detector de dispersor de luz con un flujo de nitrógeno de 1.0 SLM, una temperatura del nebulizador de 60°C y del evaporador de 80°C, y las señales obtenidas fueron comparadas con los estándares.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Purificación de inulinasas de una mezcla comercial, Novozym 960 de *Aspergillus niger*

6.1.1. Metodología de purificación

Se determinó la actividad de la mezcla de enzimas novozym 960; los productos de hidrólisis tanto para inulina de achicoria como agavina al 0.5%, se observan en el curso temporal de la reacción y se analizaron mediante cromatografía en capa fina (TLC). En éstas se observa (Figura 5) que la enzima degrada por completo a la inulina de achicoria hasta fructosa, ya que el r_f para los estándares de fructosa y glucosa se calculó un promedio de 0.62, obteniendo un r_f de 0.63 para las bandas superiores en la cromatoplaque y un r_f de 0.55 para un fructooligosacarido (no identificado), mientras que para la agavina, la enzima no la utiliza como sustrato, mostrando señales intensas en el punto de aplicación en la cromatoplaque (Figura 6). Sin embargo, se muestra una ligera banda a mitad de la cromatoplaque, con un r_f de 0.5, indicando que si hubo hidrólisis. Las enzimas de *A. niger* solo actuaron sobre la inulina de achicoria, la exo-inulinasa cortando enlaces β -(2,1) en los extremos, generando fructosa y la endo-inulinasa en los enlaces β -(2,6), generando IOS.

Estándares Glu. Fru. Inu.

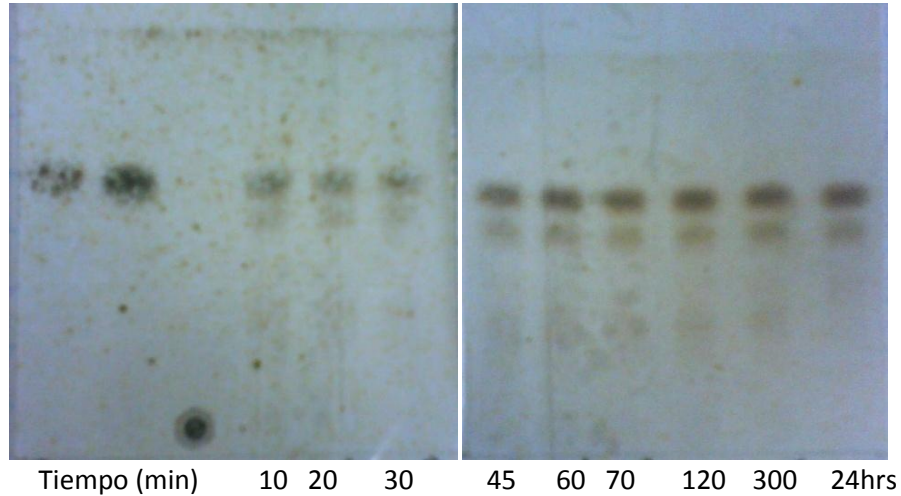


Figura 5. Cromatoplaqa de los productos de reacción con inulina de achicoria al 0.5%, utilizando la mezcla Novozym960. Temperatura: 50°C, buffer de acetatos 20 mM, pH 5.5.

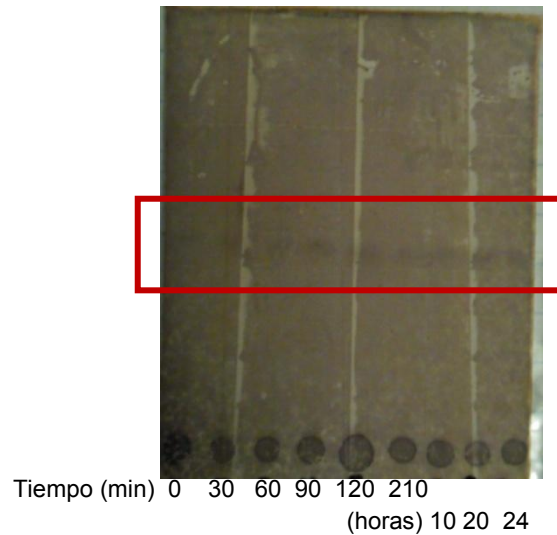


Figura 6 Cromatoplaqa de los productos de reacción con agavina al 0.5%, utilizando la mezcla Novozym960. Temperatura: 50°C, buffer de acetatos 20 mM, pH 5.5.

Una vez rectificada la actividad de la enzima control sobre las diferentes inulinas, se procedió a la precipitación por saturación con sulfato de amonio a las distintas concentraciones mencionadas previamente en la metodología (65%, 80% y 95%), las muestras se dializaron para eliminar la sal y posteriormente se dio paso a la separación por intercambio aniónico, empleando una columna empaquetada manualmente, haciendo pasar las distintas muestras dializadas con la finalidad de unir la enzima a la fase estacionaria, la enzima se lavó (lavado inicial LI) y posteriormente se despegó con diferentes concentraciones de NaCl (0.2 M, 0.3 M,

0.5 M, 0.7 M y 1 M) y finalmente la columna se lavó (lavado final LF). Después se prosiguió a la verificación de actividad de la enzima, resultando que todas las fracciones tienen actividad, mostrando así que la concentración salina no inhibe su actividad.

En la purificación del primer precipitado (65% $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$) se obtuvo la mayor producción de fructosa y de inulooligosacaridos (IOS). Como se observa en la Figura 7, se consume toda la inulina y además se observa la presencia de IOS desde los 30 minutos con r_f de 0.55 y 0.44, la fructosa presentó un r_f de 0.62. Además se puede notar que la fracción eluída con 1 M de NaCl contiene principalmente a la endo-inulinasa ya que se observa una banda más oscura indicando mayor producción de IOS.

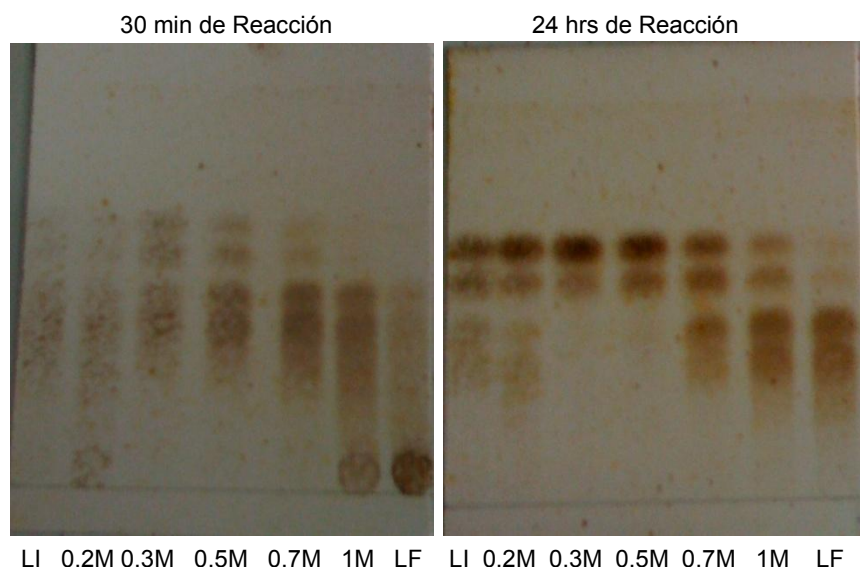
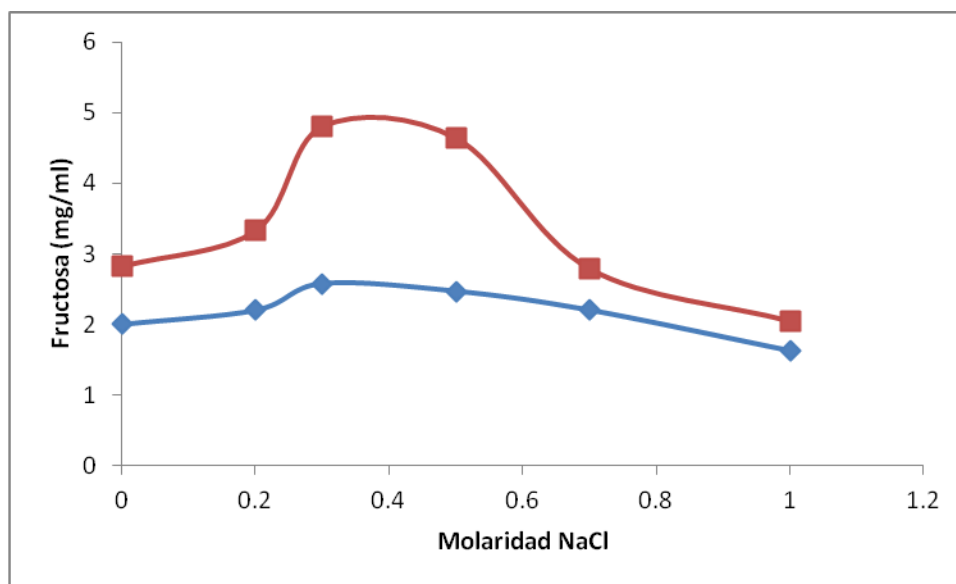


Figura 7. Cromatopla de los productos de reacción de las fracciones del precipitado al 65% de saturación. La reacción se llevó a cabo con 0.5% de inulina de achicoria, a 50°C, buffer de acetatos 20 mM, pH 5.5. En cada carril se aplicaron las fracciones eluídas con las diferentes concentraciones de NaCl. En el primer carril de izquierda a derecha se aplicó la reacción del lavado inicial (LI) y en el último carril la fracción del lavado final (LF).

Una vez observado el perfil de producción tanto de fructosa como de IOS por TLC, este dato nos permitió ubicar tanto a la exo como a la endo inulinasa en cada fracción a través de su actividad. Una manera de analizar la actividad de las fracciones fue mediante la reacción de hidrólisis de la inulina de achicoria, cuantificando azúcares por el método DNS, con la previa realización de una curva

patrón (Gráfica 1, apéndice) de concentraciones conocidas de fructosa. La reacción se midió tanto a los 30 min como a las 24 h, la actividad de la enzima se hace notoria a las 24 horas observándose un máximo de actividad en la fracción de 0.3 y 0.5 M (Gráfica 1), de acuerdo a los resultados de TLC (Figura 7), en donde la presencia de fructosa en esas fracciones abunda, la enzima presente es la exo-inulinasa. En las fracciones 0.7 M y 1 M observamos presencia de IOS por lo también se encuentra a la endo-inulinasa.



Gráfica 1 Determinación de la actividad de la proteína precipitada a 65% de saturación, reaccionando con inulina de achicoria al 0.5% a pH 5.5 temperatura 50°C; a los ◆ 30 min ■ 24 hrs.

Para la purificación del segundo precipitado (80% de sulfato de amonio), de igual forma se obtiene un mayor contenido de fructosa por DNS para las fracciones 0.3M y 0.5M (Gráfica 2), aunque menor que en el precipitado 1 (65%), esto podría deberse a que la mayor cantidad de nuestra enzima se encuentre en el primer precipitado. En la Figura 8, se observa que a las 24 hrs de reacción se hidrolizó todo el sustrato a diferencia de a los 30 min de reacción que no fue hidrolizada toda la inulina de achicoria, principalmente en las fracciones del lavado inicial y de 0.2M, debido a que el grueso de la proteína se está uniendo a la columna y estas fracciones quedan con poca concentración de la enzima.

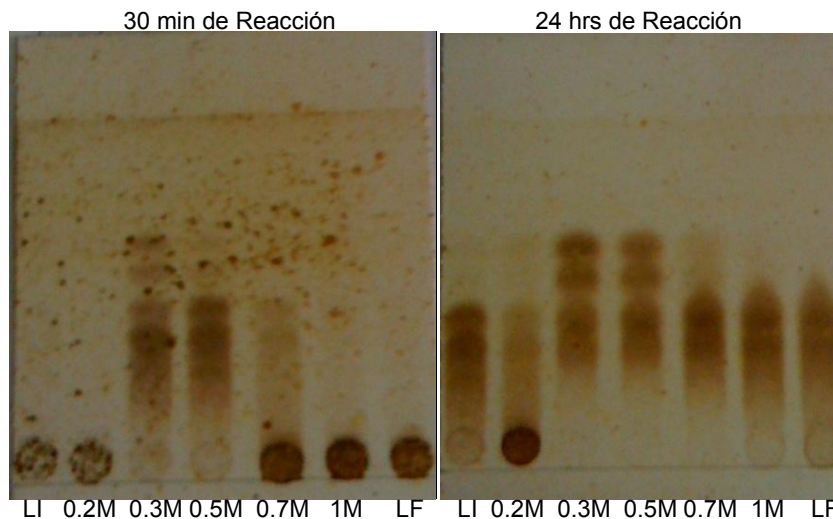
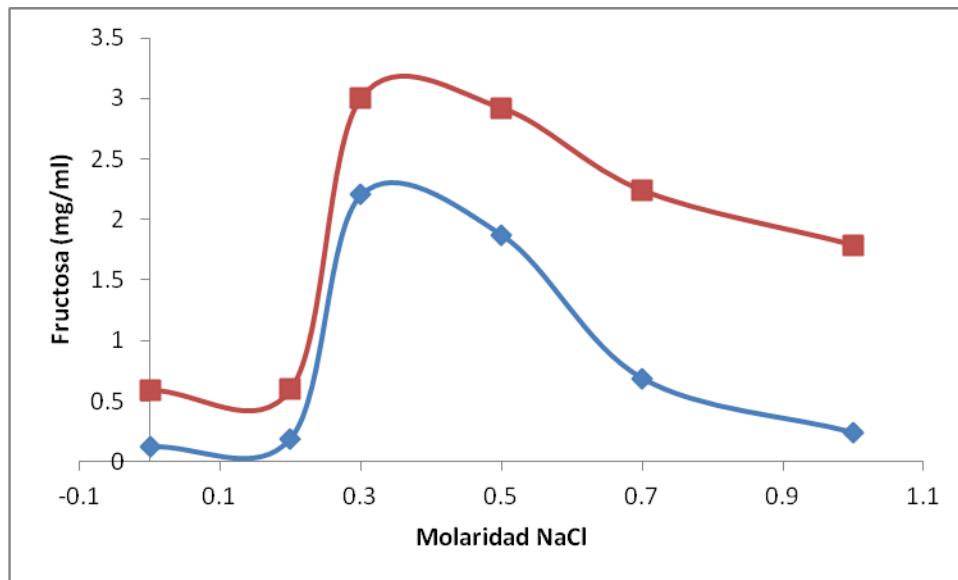


Figura 8. Cromatoplaque de los productos de reacción de las fracciones del precipitado al 80% de saturación. La reacción se llevó a cabo con 0.5% de inulina de achicoria, a 50°C, buffer de acetatos 20 mM, pH 5.5. En cada carril se aplicaron las fracciones eluidas con las diferentes concentraciones de NaCl. En el primer carril de izquierda a derecha se aplicó la reacción del lavado inicial (LI) y en el último carril la fracción del lavado final (LF).



Gráfica 2. Determinación de la actividad de proteína precipitada a 80% de saturación, reaccionando con inulina de achicoria al 0.5% a pH5.5 temperatura 50°C, a los ◆ 30 min ■ 24 hrs.

Se observa que a los 30 min solo la fracción 0.3M genera fructosa con un rf de 0.63 y a las 24 horas la fructosa también aparece en la fracción 0.5M con un rf de 0.6 por lo que nuevamente la exo-inulinasa se encuentra en estas fracciones. La endo-inulinasa se encuentra en las fracciones 0.7, 1 M y lavado final, en donde la producción de fructosa es casi nula y se encuentran IOS con rf de 0.55 y 0.43.

Los resultados del precipitado 3 (95% de sulfato de amonio) marcan la misma tendencia que en los anteriores, mayor productos de hidrólisis en las fracciones 0.3M y 0.5M y menor producción en las fracciones de lavado inicial y 0.2M. Como se muestra en la Tabla 3, el precipitado de 65% tiene un mayor contenido en proteína, esto explica que se haya consumido toda la inulina a diferencia de los otros 2 precipitados, donde el contenido de proteína disminuye, de igual forma, el contenido proteico encontrado en las fracciones 0.3M y 0.5M es el de mayor contenido para los 3 precipitados.

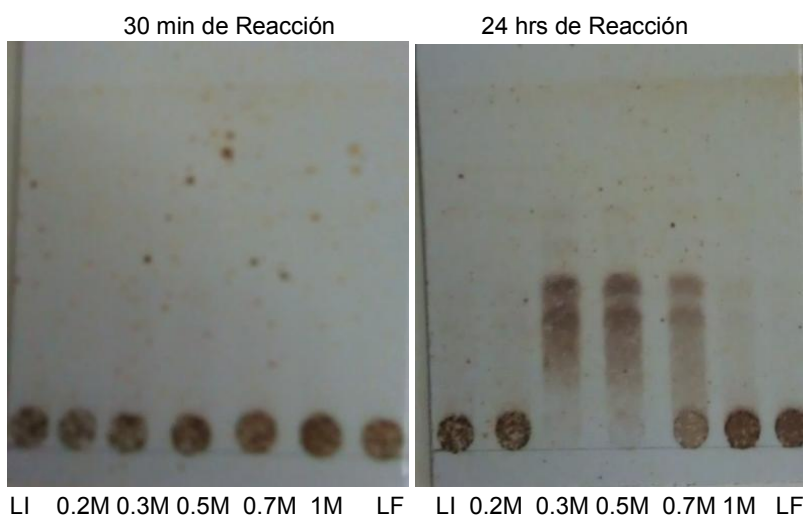
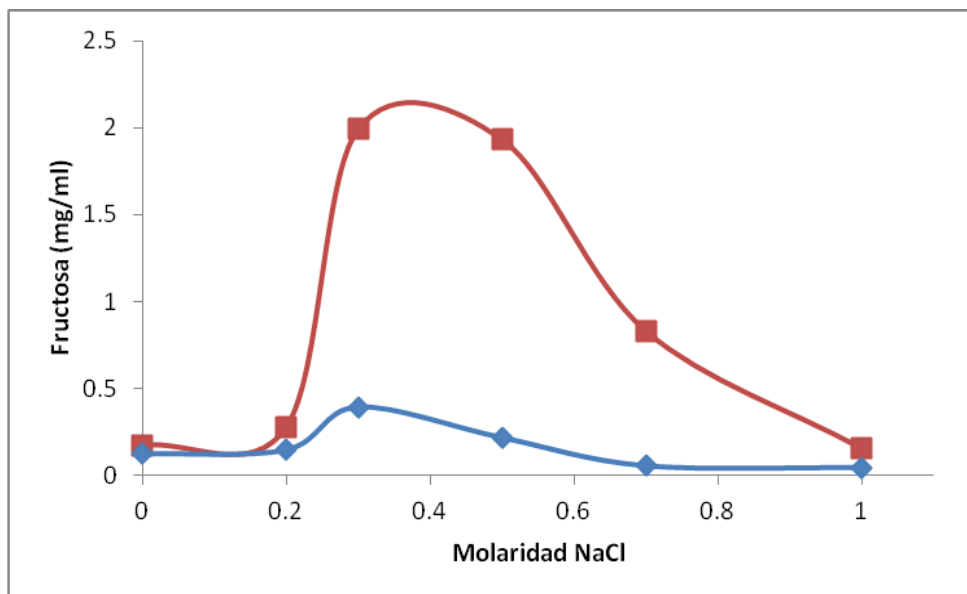


Figura 9. Cromatoplaqa de los productos de reacción de las fracciones del precipitado al 95% de saturación. La reacción se llevó a cabo con 0.5% de inulina de achicoria, a 50°C, buffer de acetatos 20 mM, pH 5.5. En cada carril se aplicaron las fracciones eluídas con las diferentes concentraciones de NaCl. En el primer carril de izquierda a derecha se aplicó la reacción del lavado inicial (LI) y en el último carril la fracción del lavado final (LF).

A diferencia de los resultados anteriores, en las fracciones del precipitado al 95%, solo se aprecian productos en las fracciones 0.3M, 0.5M y 0.7M, con hidrólisis por completo del sustrato, con excepción de la fracción 0.7M. Como se muestra en TLC (Figura 9) y en la actividad (Gráfica 3), la actividad se ve incrementada hasta las 24 h de reacción produciendo principalmente IOS por la endo-inulinasa, ya que se aprecian bandas con una tenue oscuridad, mostrando r_f de 0.50 y 0.38. Cabe señalar que en la medición por DNS todas las lecturas arrojan datos, como se ve en la Gráfica 3, pero en TLC solo se detectaron los productos en las fracciones que generaron mayor contenido de estos, siendo el mínimo detectado de 0.83 mg/ml.



Gráfica 3. Determinación de la actividad de proteína precipitada a 95% de saturación con inulina de achicoria al 0.5% a pH5.5 temperatura 50°C; a los ◆ 30 min ■ 24 hrs.

El siguiente paso fue cuantificar la cantidad de proteína presente en cada fracción, para lo cual se realizó una curva patron de proteína utilizando una solución stock de albumina sérica bovina (Gráfica 2, anexo). En la Tabla 3, se reporta las concentraciones de proteína presentes en cada fracción y se puede observar que en las fracciones 0.3 M y 0.5 M es donde hay mayor concentración de proteína de los tres precipitados, encontrando a la fracción 0.5M con mayor contenido en proteína para los precipitados 1 (65%) y 3 (95%), la diferencia para el tercer precipitado no es muy significativa, ya que los valores oscilan en el mismo intervalo. Sin embargo, para el precipitado 2 (80%) se encuentra que en la fracción 0.3M es la que tiene una mayor concentración de proteína.

Considerando el contenido de proteína y la producción de fructosa, la fracción de purificación más eficaz es 0.3M de NaCl, se mostró que aunque no sea la fracción con mayor contenido de proteína, si es la que produce mayor concentración de fructosa, medida por el método DNS. Se cree que la exo-inulinasa se concentró más en esta fracción.

Tabla 3. Contenido de proteína, actividad enzimática medida a los 30 min de reacción y actividad específica de las diferentes fracciones de los 3 precipitados de Novozym 960

| Fracción de purificación | | Lavado inicial (LI) | 0.2M NaCl | 0.3M NaCl | 0.5M NaCl | 0.7M NaCl | 1M NaCl | Lavado final (LF) |
|-----------------------------------|--|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------|-------------------|
| Volumen total de la fracción (ml) | | 50 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 150 |
| Precipitado 65% | Concentración (µg/ml) | 257.1 | 1084.2 | 4817.7 | 7089.4 | 1357.8 | 685.7 | 1791 |
| | Actividad enzimática (µg fructosa/min) U | 333.3 | 366.6 | 428.3 | 411 | 366.6 | 270 | 243.3 |
| | Actividad Específica (U/mg proteína) | 1296.3 | 1690.6 | 444.5 | 298.86 | 1349.9 | 1968.7 | 135.8 |
| | U totales (U/ml totales de la fracción) | 6.6 | 36.66 | 42.83 | 41.1 | 36.66 | 27 | 24.33 |
| Precipitado 80% | Concentración (µg/ml) | 14.4 | 120 | 231.2 | 176.1 | 71.3 | 37.1 | 11.5 |
| | Actividad enzimática (µg fructosa/min) U | 19.6 | 31.6 | 366 | 300 | 113 | 40 | 18 |
| | Actividad Específica (U/mg proteína) | 1250 | 1316.6 | 7915.2 | 8517.8 | 7924.2 | 5390.8 | 1565.2 |
| | U totales (U/ml totales de la fracción) | 0.38 | 3.16 | 36.6 | 30 | 11.3 | 4 | 0.12 |
| Precipitado 95% | Concentración (µg/ml) | 1.6 | 63.8 | 70.8 | 76.2 | 30.6 | 1.6 | 1.6 |
| | Actividad enzimática (µg fructosa/min) U | 20 | 23.3 | 65 | 36.6 | 9.16 | 7.5 | 6.6 |
| | Actividad Específica (U/mg proteína) | 12500 | 1826 | 4590.4 | 2401.5 | 1006.5 | 23437.5 | 4125 |
| | U totales (U/ml totales de la fracción) | 0.4 | 2.33 | 6.5 | 3.66 | 9.16 | 0.75 | 0.044 |

La evaluación de la producción de una enzima por fermentación microbiana se determina por los parámetros de rendimientos (unidad de actividad/mg de células) 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 (Greasham-Inamine, 1986; Hensing et al., 1995; Liu et al., 2005; Xiong et al., 2007). Definiendo a la unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 μmol de sustrato por minuto, bajo condiciones bien definidas (Sapar-Schmidt, et al, 1979).

Calculando la actividad enzimática de cada fracción, se presenta la misma tendencia que el contenido de proteína, pues las fracciones con mayor actividad resultaron de nuevo las fracciones 0.3 M y 0.5 M, aunque se obtiene que la fracción 0.3 M es la de mayor actividad, y como se vio en previas cromatoplasmas (Figuras 7, 8 y 9) la actividad predominante es de la exo-inulinasa.

Actividad y proteína total generalmente disminuyen con cada paso de purificación. La actividad disminuye debido a alguna pérdida que se produce debido a la inactivación o interacciones no ideales con materiales cromatográficos u otras moléculas en la solución. La proteína total disminuye porque el objetivo es eliminar la mayor cantidad de proteínas no deseadas o no específicas como sea posible. En un paso exitoso, la pérdida de proteína no específica es mucho mayor que la pérdida de actividad; Por lo tanto, la actividad específica aumenta (Lehninger, 2005), es por esto que la actividad específica da una idea de la pureza de la enzima. Con este parametro observamos que en el segundo precipitado las fracciones 0.3M, 0.5M y 0.7M son las más puras, con 7915.2, 8517.8 y 7924.2 U/mg proteína, respectivamente. Sin embargo el tercer precipitado es el que muestra resultados de mayor pureza en las fracciones de LI con 12500 U/mg proteína y 1M NaCl con 23437.5 U/mg proteína. para las fracciones del precipitado uno se observo que las fracciones 0.3M y 0.5M fueron las más puras, aunque no la misma pureza presentada por las fracciones del precipitado dos.

Según Pandey *et al.* (1999), los mejores resultados de producción de inulinasa son dados por los mohos *Aspergillus niger* (75 U/ml) y *A. niger* A42 (4600 U/g). Sin olvidar que el rendimiento mostrado en este trabajo es de una mezcla enzimática comercial y no del crecimiento microbiano directamente.

6.1.2. Detección de las inulasas novozym 960 por SDS PAGE

En la electroforesis realizada a las diferentes fracciones de purificación y al control (Figura 10) se encontraron 3 bandas, las mismas que se pueden apreciar en las figuras 11, 12 y 13, en la cual se puede ver una banda por los 66.2 kDa junto al marcador de albúmina sérica bovina (BSA), las otras 2 bandas indican pesos moleculares más bajos al marcador; se encontró que para las exo y endo inulasas tienen pesos menores, la exo-inulinasa de *Aspergillus niger* reporta 59.15 kDa y endo-inulinasa de *Aspergillus niger* reporta 53.47 kDa (BRENDA Database Enzyme 695820), por lo que se interpreta que las bandas de menor peso son para exo y endo. Se observa que la purificación de las proteínas no es total. Sin embargo, se puede observar que en las fracciones 0.7 M y 1 M es predominante una sola banda donde probablemente se encuentra la endo inulinasa y en las fracciones 0.3 y 0.5 se observa que existen 2 bandas predominantes correspondientes una a la exo-inulinasa y probablemente la segunda menos concentrada a la endo-inulinasa.

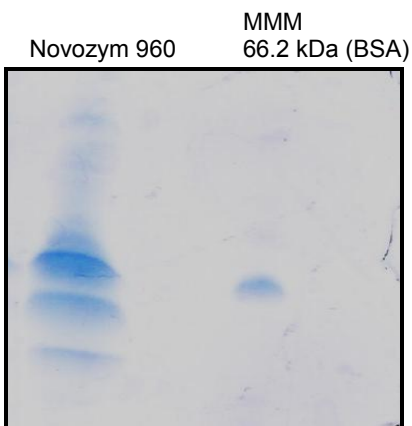


Figura 10. Gel de poliacrilamida con la mezcla comercial Novozym 960 a la izquierda y marcador de BSA a la derecha.

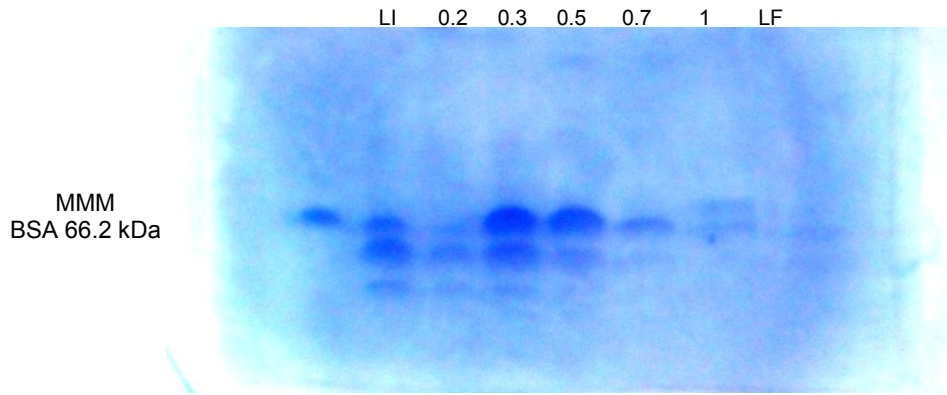


Figura 11. Gel de poliacrilamida con las fracciones colectadas de la purificación por columna aniónica, que se identificaron como lavado inicial, 0.2M, 0.3M, 0.5M, 0.7M, 1.0M y lavado final que van de izquierda a derecha para el 1° precipitado a 65% de saturación.

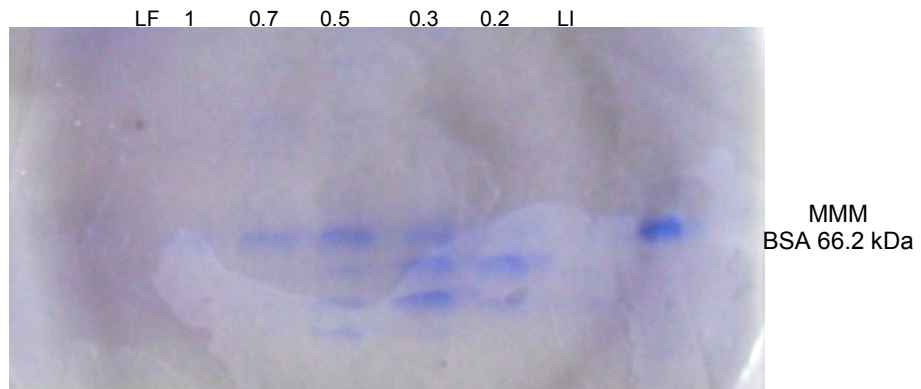


Figura 12. Gel de poliacrilamida con las fracciones colectadas de la purificación por columna aniónica, que se identificaron como lavado final, 1M, 0.7M, 0.5M, 0.3M, 0.2M y lavado inicial que van de izquierda a derecha, para el 2° precipitado a 80% de saturación.

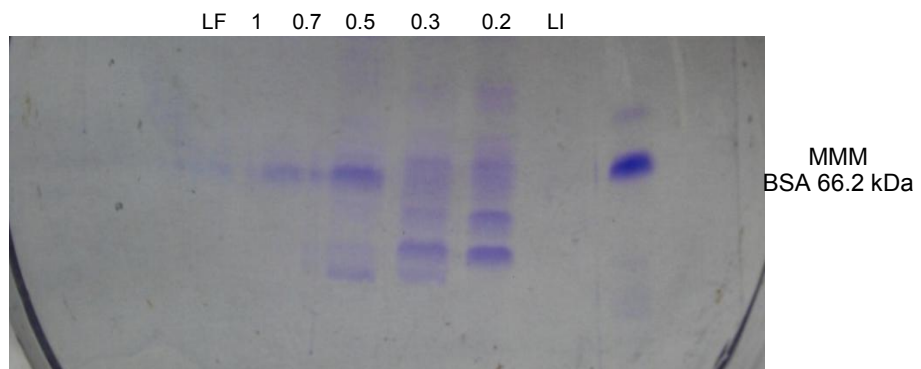


Figura 13. Gel de poliacrilamida con las fracciones colectadas de la purificación por columna aniónica, que se identificaron como lavado final, 1M, 0.7M, 0.5M, 0.3M, 0.2M y lavado inicial que van de izquierda a derecha, para el 3° precipitado a 95% de saturación.

6.1.3. Separación de las proteínas por FPLC

Posteriormente se procedió a la separación de las proteínas por intercambio aniónico, empleando la misma técnica descrita en 5.2.4 para la purificación de cepas de *K. marxianus*. Como resultado se obtuvo un cromatograma con 5 señales, 3 de las cuales se mostraban juntas, por lo que se determinó la concentración salina con el mismo equipo. En el cromatograma se aprecian varias líneas de colores que indican diferentes mediciones, así como la azul muestra la señal de UV a 280nm, la café la conductividad medida en mS/cm y la línea verde indica el gradiente salino medido en porcentaje, esta última se utilizó para determinar la concentración de sal a la cual salían las señales azules (proteína), gracias a esto se optó por emplear un gradiente salino segmentado (Figura 14), en el cual se aprecian las mismas 5 señales, 2 de las cuales no aparecen en el gradiente salino, la primer señal aparece antes del gradiente salino. Esto comparándolo con el análisis manual, nos da certeza de que en la fracción de lavado inicial si hay proteínas que no se unen a la columna. Las señales a continuación de la primera señal se obtuvieron con un gradiente salino que fue 12% de una solución de NaCl al 1M para la segunda señal, la tercera señal corresponde a un 19% de NaCl, la cuarta señal es de un 30% de NaCl y la quinta señal corresponde al 100% de NaCl, lo que corresponde a una concentración 1M de NaCl, que equivale a la fracción 1 M y lavado final del análisis manual; calculando por factor unitario la molaridad de los porcentajes antes dichos obtenemos que:

$$\left(\frac{1\text{M NaCl}}{100\% \text{ gradiente}} \right) (\% \text{ gradiente}) = \text{M NaCl}$$

- 12%= 0.12M \approx 0.1M
- 19%= 0.19M \approx 0.2M
- 30%= 0.3M \approx 0.3M

Con los datos anteriores se observa que es más específico el método por FPLC que la columna empacada manualmente, aunque estas dos trabajen por intercambio aniónico. Sin embargo, aunque la separación por FPLC proporciona mejores resultados, la metodología manual arrojó resultados muy similares, encontrando que la fracción más predominante en esta mezcla comercial de enzimas, es la que se obtiene con 0.3M de NaCl, que en el cromatograma se observa en la señal al 30% de la solución de NaCl 1M, como se demostró por factor unitario, la cual es más intensa. Como se observa en la Figura 14 las proteínas se separan en su totalidad, esto se comparó con un gel SDS-PAGE (no mostrado), en el cual aparecieron las mismas 3 bandas observadas en la Figura 10, sin embargo solo una de ellas se intensificó y las 2 restantes apenas se lograba observarlas.

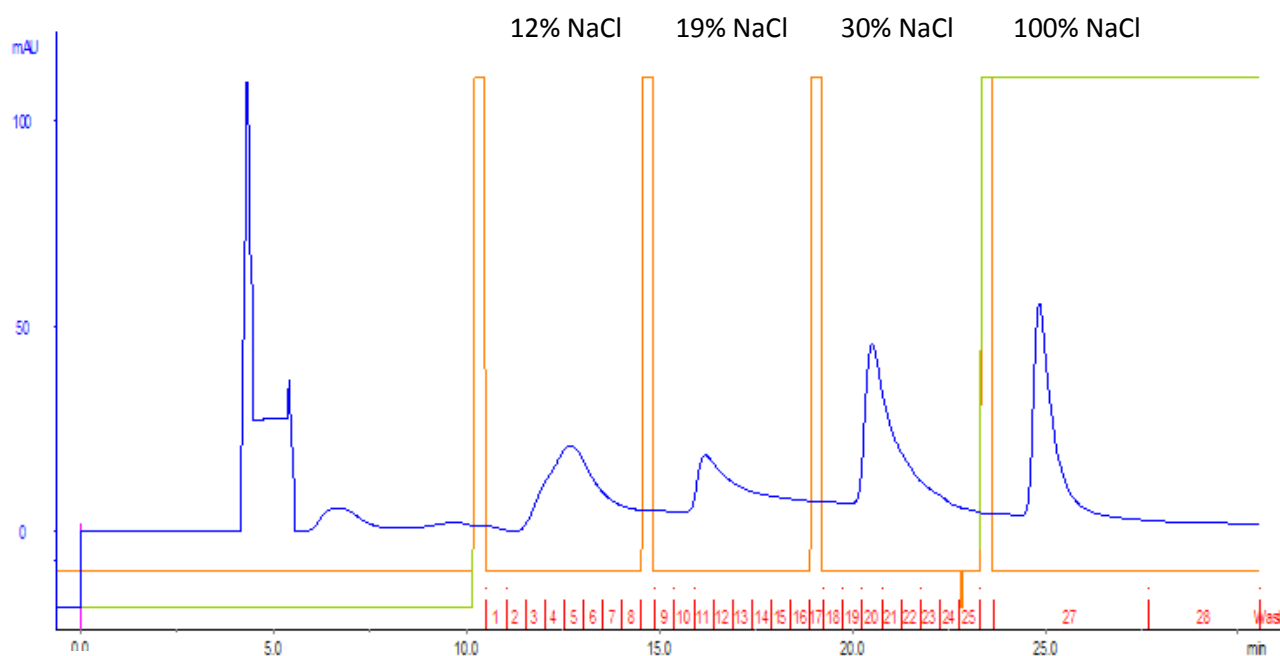


Figura 14. Cromatograma de la mezcla comercial Novozym 960, con gradiente segmentado de 12%, 19%, 30% y 100% de una solución de NaCl 1M, con un flujo de 1ml/min.

Para finalizar se determinó la actividad enzimática de la fracción colectada en el FPLC al 30% de NaCl (aproximadamente a 0.3M NaCl), en un medio teniendo como sustrato agavina al 0.5%, se observa que su actividad es nula, se puede apreciar que el sustrato no se hidrolizó (puntos de aplicación en la TLC) y las

bandas de fructosa no se colorearon, a diferencia de las bandas de los estándares de glucosa y fructosa (Figura 15). Gracias a esto se determinó que la mezcla enzimática Novozym 960 De *Aspergillus niger* no es degradadora de la agavina.

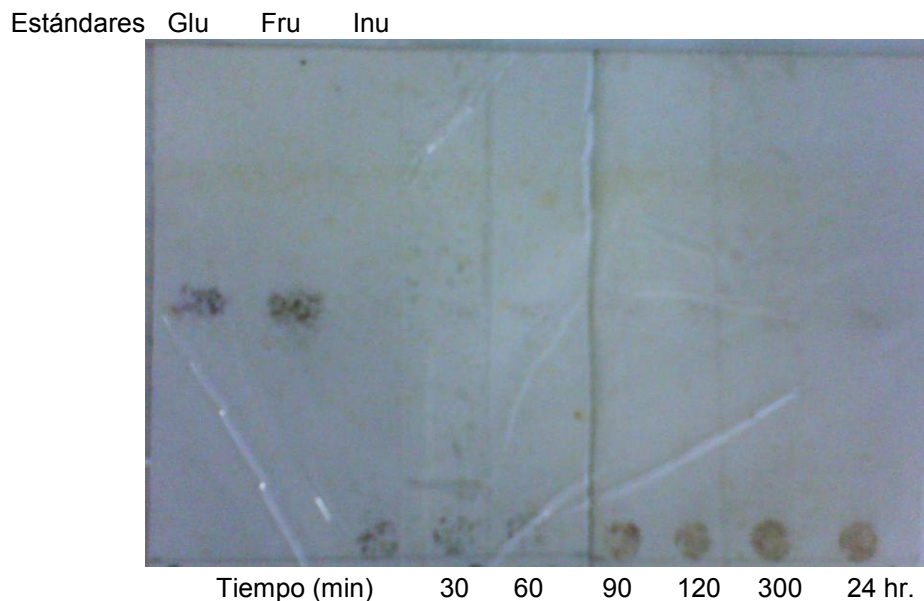


Figura 15. Cromatoplaqueta de la reacción de agavina al 0.5% con la fracción obtenida por FPLC (30% de solución de NaCl) a los diferentes tiempos expresados en minutos.

6.2. Extracción y purificación de inulinasas a partir de cepas de *Kluyveromyces marxianus*

6.2.1. Evaluación de actividad enzimática

Se realizaron pruebas preliminares, de los medios de cultivo, identificándolos como extracelular (ext.) y extracelular liofilizado (ext.L) para las cepas IS03 y AZ8, esto para cerciorarse tanto que las proteínas obtenidas tuvieran actividad, y que dicha actividad no se perdiera una vez realizada la liofilización, de igual manera para el extracto intracelular (int.) de las cepas IS03 y AZ8, que fueron los sobrenadantes de la ruptura celular de dichas cepas. Para las reacciones con inulina de agave se dejó actuar por 24 horas para su posterior análisis por TLC.

En la Figura 16 se observa la cromatoplaqueta con los productos de hidrólisis de las enzimas extracelulares, se muestran bandas de fructosa a partir de agavina, con

un r_f de 0.61, y que el sustrato no se hidrolizó por completo. Se eligió el procedimiento de liofilización frente al de precipitado por saturación de sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$, ya que en este se evita la diálisis, se concentra en su totalidad el soluto del cultivo, evitando pérdidas de proteínas y las 2 técnicas muestran conservar la actividad enzimática. En la Figura 17, que corresponde a las enzimas intracelulares, se aprecian las bandas de fructosa con r_f de 0.62, sin embargo se presenta una banda por debajo de esta; en la técnica de capa fina, para este caso, entre más peso molecular tengan los compuestos menos distancia recorren, y viceversa, entre menos peso mas distancia se recorren, por lo que las bandas observadas indican la presencia de polímeros de bajo peso molecular. Lo que nos demuestra que las enzimas producidas tanto por la cepa IS03 y AZ8 presentan actividad frente a la agavina.

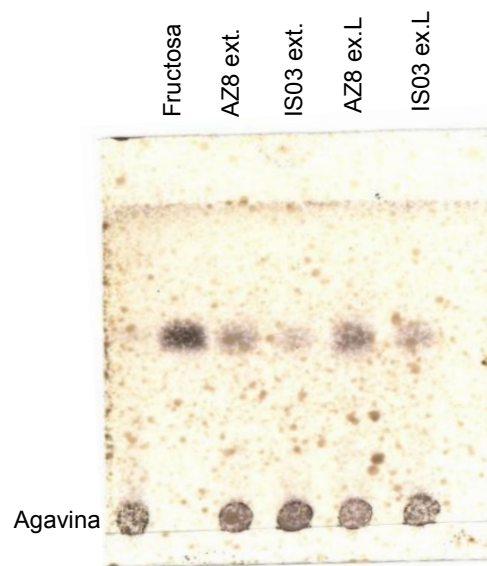


Figura 16. Cromatopla de la reacción fracciones extracelulares con agavina al 1%. De izquierda a derecha se observa estándar de agavina al 1% tratada con las condiciones de reacción (buffer de acetatos 20mM pH 5.5 50°C), fructosa al 1%, AZ8 extracelular, IS03 extracelular, AZ8 extracelular liofilizado e IS03 extracelular liofilizado.



Figura 17. Cromatopla de la reacción de fracciones intracelulares con agavina al 1%. De izquierda a derecha se observa estándar de agavina al 1% tratada con las condiciones de reacción (buffer de acetatos 20mM pH 5.5 50°C), AZ8 intracelular e IS03 intracelular.

A diferencia de la enzima novozym 960, estas enzimas si actúan sobre enlaces β -(2,6) glucosídicos, mayormente presentes en la agavina, y también hidroliza enlaces β -(1,2) glucosídicos.

6.2.2. Intercambio aniónico por FPLC

Obteniendo las fracciones liofilizadas y los sobrenadantes de la ruptura celular de las cepas AZ8 e IS03, se hicieron pasar por el equipo cromatográfico de proteínas, FPLC. En la Figura 18 se muestra a la IS03 ext., donde podemos observar 2 señales que destacan, medidas por UV a 280nm, una de ellas antes de comenzar el gradiente lineal salino, que corresponde a la fracción de proteína que no se une a la columna, esta se manejó en una sola fracción, identificada como IS03 ext. 1. Una vez iniciado el gradiente salino (indicado con la línea verde), la señal muestra lo que puedan ser varias proteínas no separadas, ya que se alcanza a distinguir 3 cumbres en la señal.

Con el equipo cromatográfico se determinó el porcentaje salino (escala a la derecha de la imagen) de cada señal, debido a que estas se mostraron juntas, obteniendo así un 44% para el primer pico formado, 55% para el segundo y 77% para el tercero; con esto se pretendía generar un gradiente segmentado, como antes visto en el cromatograma de la Figura 14. Una vez introducida la muestra se

perdieron las señales, debido al contenido de proteína (Tabla 4), hecho que ocurrió con las 3 muestras cuando se hicieron pasar por el FPLC una segunda vez, por lo que se decidió trabajar por colectas de fracciones de 0.5 ml, reuniendo así las fracciones 11-15, 16-18 y de la 19-21, como se indica con los círculos rojos, recuperando así el grueso de la proteína, estas fracciones fueron identificadas con el mismo número.

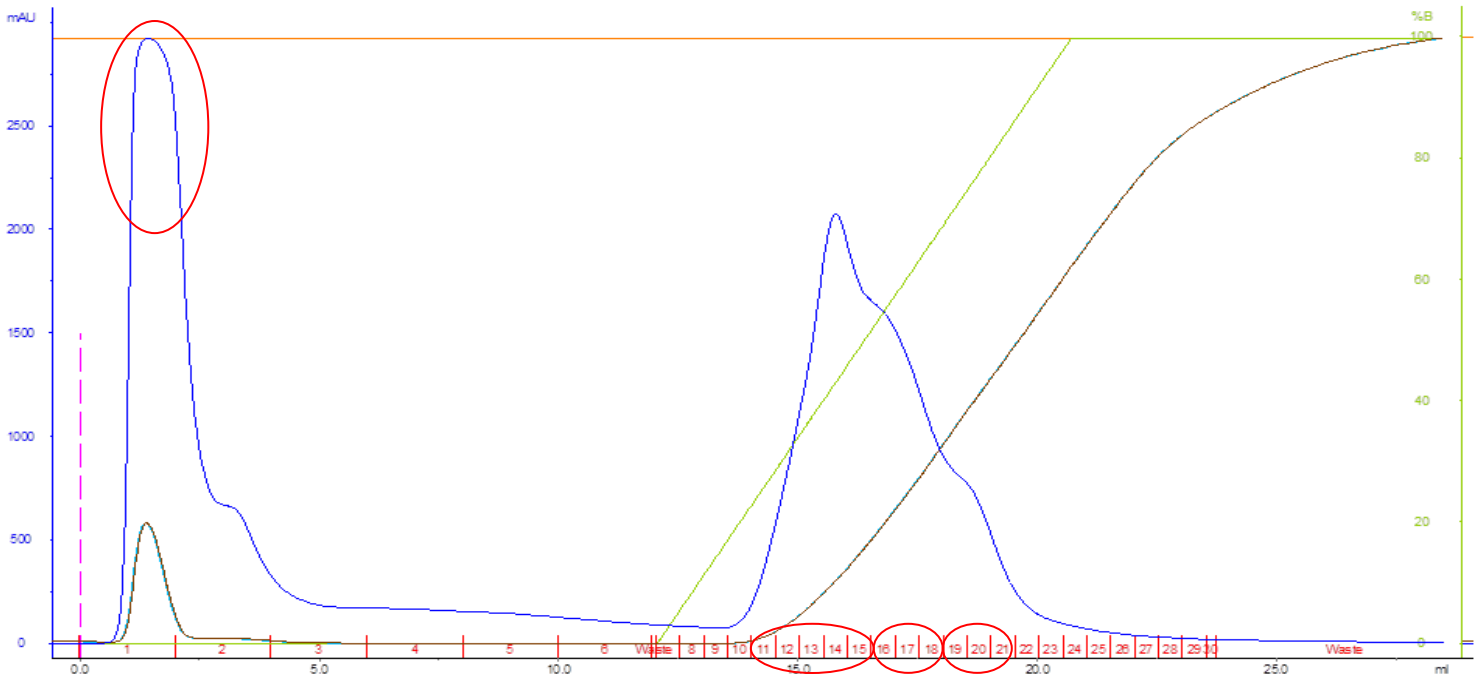


Figura 18 Cromatograma de IS03 extracelular liofilizado con un flujo de 1ml/min.

Por otra parte se analizó la AZ8 ext. (Figura 19) utilizando la misma metodología (descrita en 5.2.5); nuevamente se observa una señal al inicio del gradiente lineal salino la cual se identificó como fracción AZ8 ext. 1, al final del cromatograma se observa una señal con 2 posibles proteínas, estas se colectaron por fracciones de la 11-13 y de 14-20 (círculos rojos) y con estos números se les identificó. Se puede observar que para ambos cromatogramas de las proteínas extracelulares se observa una señal al inicio, junto a una no muy intensa que para fines de esta investigación no se analizó. Las proteínas que se unieron a la columna no se separaron en ambos casos, esto podría ser una sola proteína, ya sea exo o endo inulinasa, o que se trate tanto de exo y endo inulinasas pero con distintas isoformas.

Todas las fracciones extracelulares colectadas para ambas cepas fueron puestas en reacciones con agavina al 1% en buffer de acetatos 20mM a un pH 5.5, encontrando actividad hidrolítica muy baja ya que solo se generó como productos fructosa y glucosa, y no se hidrolizó del todo el sustrato. Los productos de hidrólisis se analizaron por HPLC (6.2.4).

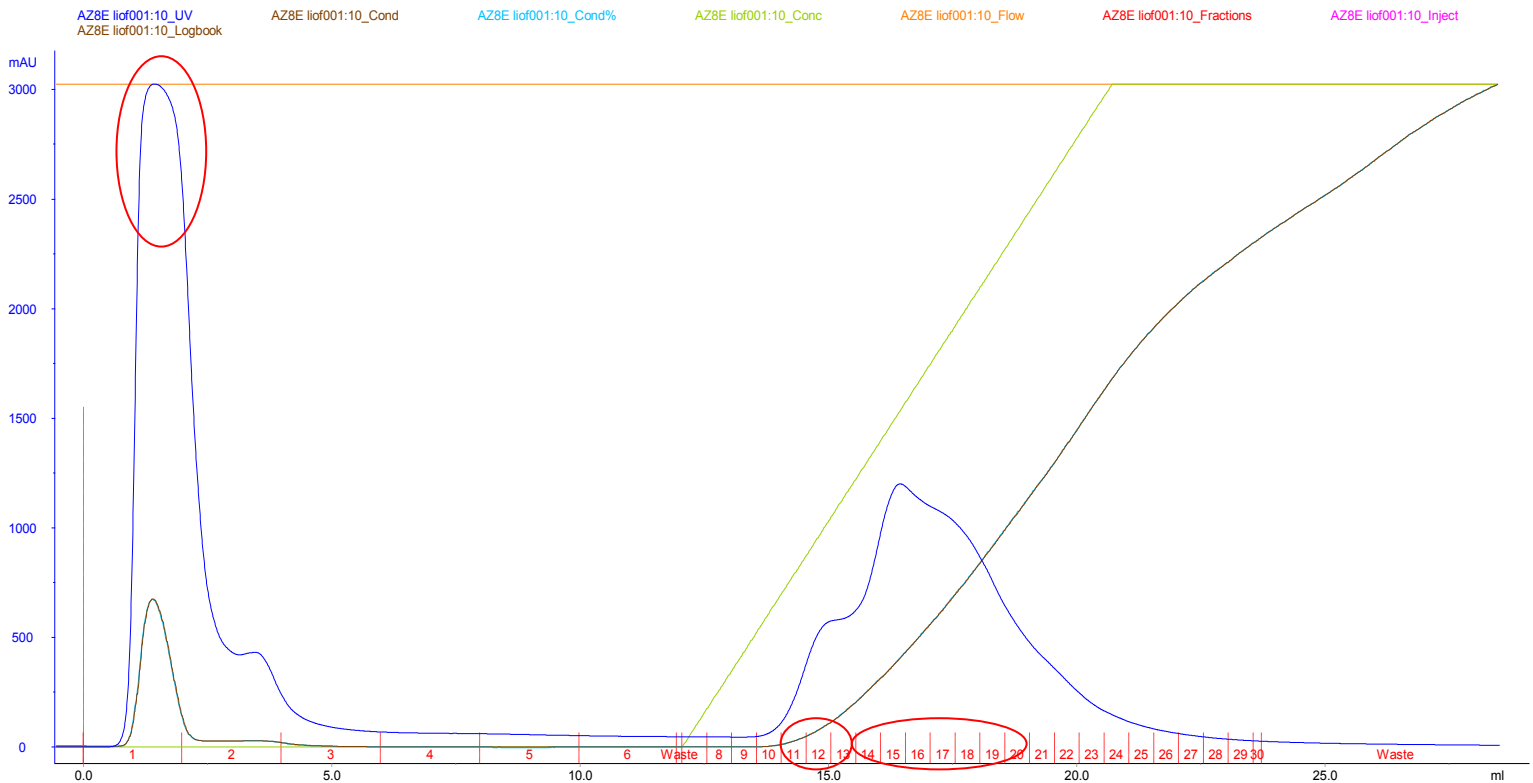


Figura 19 Cromatograma de AZ-8 extracelular liofilizado con un flujo de 1ml/min.

Para la evaluación de la IS03 int. se obtuvo la Figura 20 donde se puede apreciar 4 señales predominantes; 2 de ellas visiblemente separadas dentro del gradiente salino, se colectaron las fracciones de la 13-17 y de 19-22. Esto nos indica que las proteínas que se unen a la columna fueron separadas exitosamente, caso contrario a las proteínas que no se unen a la columna (lavado inicial) aquí se observa dos picos definidos, sin embargo no separados, por lo que se decidió colectar por picos en el equipo FPLC, cabe mencionar que esto no se pudo realizar con las proteínas extracelulares, ya que los picos no se definían claramente.

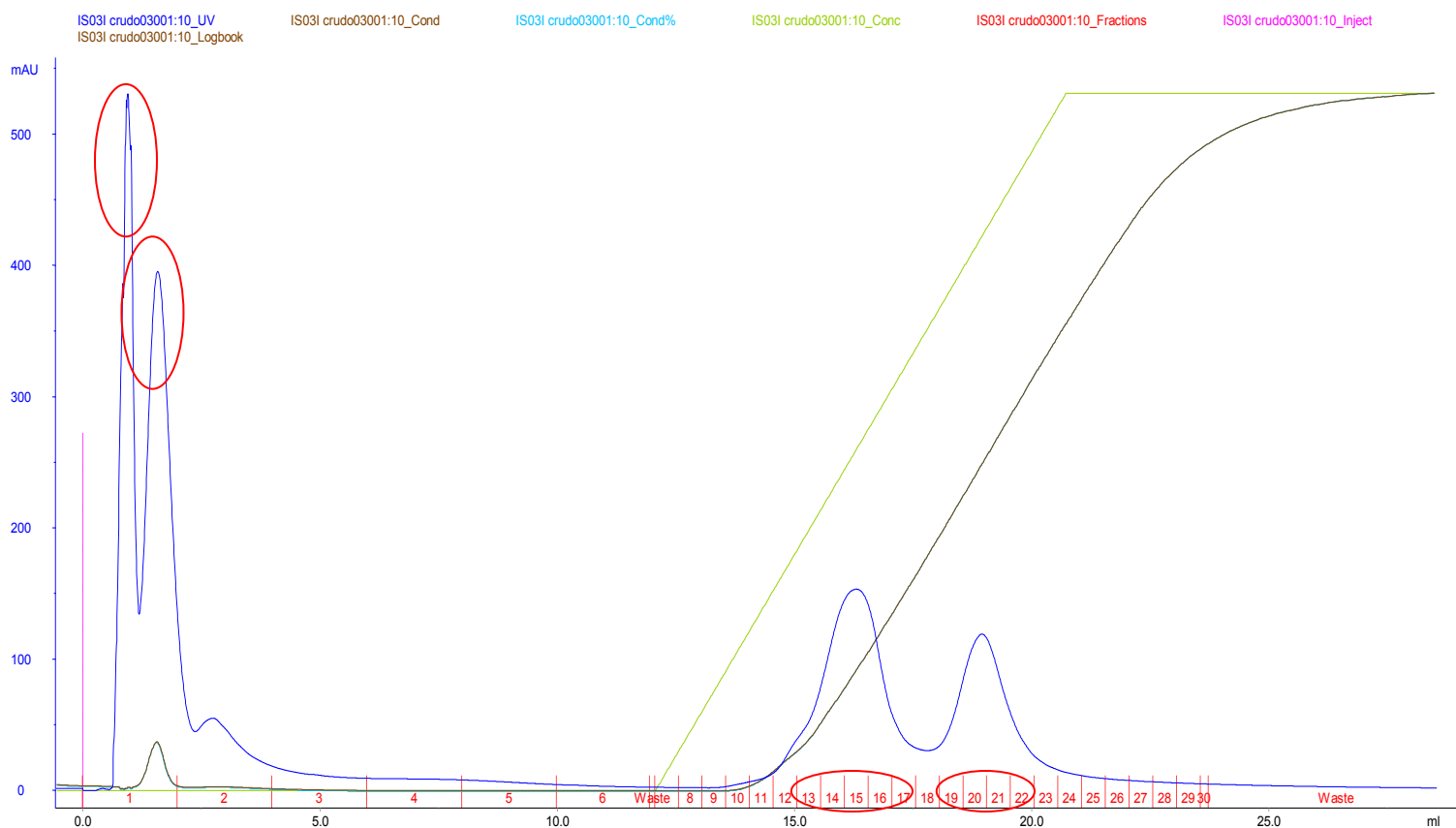


Figura 20. Cromatograma de IS03 intracelular con un flujo de 1ml/min.

En la Figura 21 se muestra la cromatoplaqueta de los productos de hidrólisis obtenidos a partir de las fracciones IS03 intracelular 1, 2, 13-17, 19-22, en esta se puede apreciar 2 bandas claramente en la parte superior de la TLC, que es la producción de fructosa con un r_f de 0.62 y glucosa, así como biopolímeros de bajo peso molecular, ya que estas señales tienen un r_f de 0.54, también se puede observar que desde un inicio de la cromatoplaqueta se colorea, alcanzando un máximo de r_f de 0.36 lo que es señal de la presencia de biopolímeros de mayor peso molecular, sin embargo se aprecia color en la parte de la aplicación de la muestra, lo que indica claramente que la agavina no se hidrolizó por completo en esta reacción a las 24 hrs.



Figura 21. Cromatopla de IS03 intracelular de las fracciones 19-22, 13-17, 2 y 1 en reacción con inulina de agave al 1% a las 24 hrs.

El análisis de las fracciones int. de la cepa AZ8 arrojó el cromatograma mostrado en la Figura 22, en este se aprecian 5 señales de proteína, presentando un patrón similar a la cepa IS03, ya que resultan 2 señales en el lavado inicial de la columna, estas se pudieron separar con el FPLC, colectándolas por picos. Aunque ambas cepas provienen del mismo microorganismo, presentan diferencias, la cepa AZ8 hidroliza toda la agavina con las enzimas intracelulares y la cepa IS03 no, se aprecian 5 señales de proteína intracelulares para la cepa AZ8 y 4 para la cepa IS03.

En la parte de separación de proteínas por gradiente salino, observamos la aparición de 3 señales de proteína, una de las cuales se logró separar en su totalidad, colectada de la fracción 19-21. Las proteínas que no se lograron separar se colectaron de la fracción 13-14 y 15-17. Posteriormente en la evaluación de la actividad enzimática se obtuvieron los resultados presentados en la Figura 23, donde es claro que la agavina fue hidrolizada en su totalidad; se observan bandas indicando la presencia de fructosa con un r_f de 0.63 y glucosa, e igual que en la Figura 21 se obtuvo una banda corrida a lo largo de la cromatopla, demostrando presencia de IOS con un r_f de 0.54 para la banda por debajo de la fructosa y 0.44 para la banda inferior.

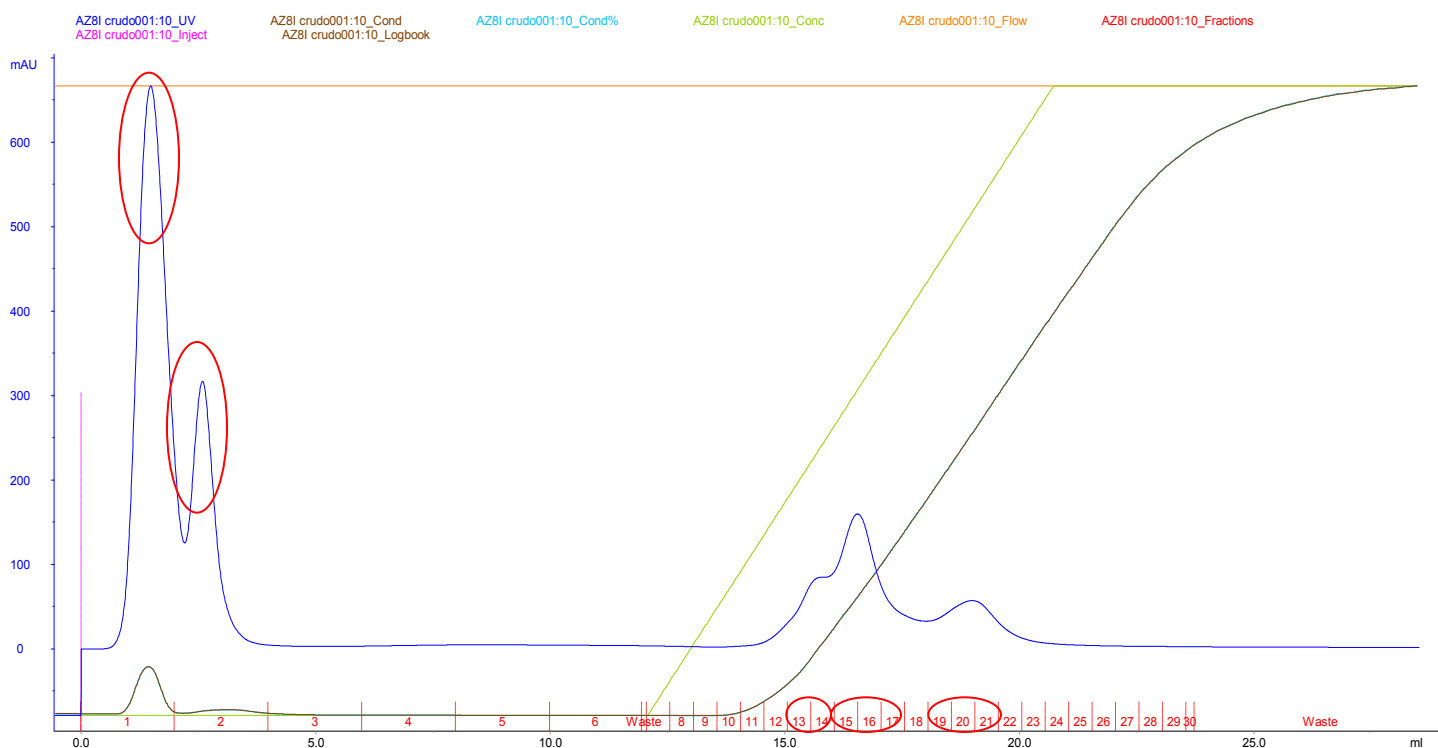


Figura 22. Cromatograma de AZ-8 intracelular



Figura 23. Cromatopla de AZ8 intracelular de las fracciones 19-21, 15-17, 13-14, 2 y 1 en reacción con inulina de agave al 1% a las 24 hrs.

Tanto en la IS03 como en AZ8 están presentes las dos enzimas, exo y endo inulinasas, ya que dan como productos a la fructosa, generada principalmente por la exo-inulinasas, que es la que actúa sobre los extremos del biopolímero (inulina), que en su mayoría son enlaces β -(2,1); también se observaron indicios de producción de IOS, generados principalmente por la endo-inulinasas, ya que su

sitio de acción es interno en la inulina y en las ramificaciones, donde se encuentran enlace β -(2,6). Las TLC se realizaron como una prueba para corroborar la actividad de las proteínas colectadas, sin embargo se realizaron pruebas con métodos más sensibles como lo es el HPLC, para la identificación de dichos IOS producidos en la hidrólisis de agavina.

6.2.3. Determinación del contenido de proteína

En la Tabla 4 se muestra el contenido de proteína determinado mediante el método de Bradford. Las muestras fueron analizadas en 2 etapas, las de inicio, que consistieron en el cultivo liofilizado, y el sobrenadante de la ruptura celular; y la segunda etapa después de la purificación que fueron todas las fracciones colectadas en el FPLC. Se utilizó una curva patrón realizada con albumina sérica bovina, partiendo de una solución stock de 0.1mg/ml (Gráfica 3, anexo).

Los cultivos microbianos se hicieron crecer en un cultivo enriquecido, descrito en el punto 5.2.1 por 36 horas esto con el fin de generar biomasa (células), posterior a esto se adicionó agavina al 1%, y se incubó por 48 hrs para la expresión de las enzimas (inulinasas). Se realizó de esta forma para asegurar que se tuviera suficiente material orgánico con el cual trabajar, ya que las levaduras tienen la ventaja sobre los hongos, como lo es el *A. niger*, de tener una mayor velocidad de crecimiento celular y presenta una adaptabilidad a diferentes condiciones y modos de cultivo, y en esto las cepas de *Kluyveromyces marxianus* han sido más estudiados (Cruz-Guerrero et al., 1995).

Con estos datos observamos que la mayor cantidad de proteína se encuentra en la primera etapa. Aunque la producción de las inulinasas es excretada al medio de cultivo (Zavala, 2011), hay un mayor contenido de proteína en las fracciones intracelulares que en las extracelulares, ya que las inulina de levaduras es una enzima extracelular parcialmente asociada a la pared celular y parcialmente excretada al medio de cultivo; es por esta propiedad que las inulinasas en levaduras pueden presentarse como enzimas extracelulares y como enzimas

intracelulares (Pandey *et al.*, 1999). Cabe destacar que no se detectan solo a las inulinasas, sino todas las proteínas contenidas en la célula.

Se observó que la producción de proteína es mayor en la cepa AZ8, en la primera etapa, sin embargo en las fracciones colectadas del FPLC (segunda etapa) hay una mayor cantidad en los resultados arrojados por la cepa IS03, esto se debe a pérdidas de la enzima durante el proceso.

Los microorganismos más comúnmente utilizados para la producción de inulinasas son las cepas de hongos como el *Aspergillus* sp y cepas de levadura como *Kluyveromyces* sp, aunque las cepas de levadura producen más inulina que las cepas de hongos y bacterias. (Castillo-Chamy, 2010), algunas cepas mutantes de levaduras, como *K. marxianus* var. *marxianus* CBS 6556, exhiben rendimientos de 3000 U/ml (Pandey, 1999). En el presente trabajo se obtuvo con *K. marxianus* que presenta hasta un 146 µg/ml en la fracción intracelular sin tratamiento. En investigaciones por el mismo equipo de trabajo (laboratorio 314 conjunto E, Facultad de Química) se encontró que *Kluyveromyces marxianus* IS03 presenta un rendimiento de 79.39 U/ml, el cual se considera un buen rendimiento en comparación con otras cepas como *K. marxianus* YS-1 que presenta un 50.2 U/ml (Singh- Bhermi, 2008), mostrado en la Tabla 2.

Tabla 4. Concentración de proteína de las diferentes fracciones de las cepas IS03 y AZ8

| Muestra | Concentración (µg/ml) | Volumen de fracción colectada (ml) | Contenido total (µg) |
|----------------------------------|-----------------------|------------------------------------|----------------------|
| IS03 extracelular liofilizada | 18.5 | ---- | ---- |
| AZ8 extracelular liofilizada | 25 | ---- | ---- |
| IS03 extracelular fracción 1 | 8.5 | 3.5 (colectada por pico) | 29.75 |
| IS03 extracelular fracción 11-15 | 2.5 | 2.5 | 6.25 |
| IS03 extracelular fracción 16-18 | 4.6 | 1.5 | 7.02 |
| IS03 extracelular fracción 19-21 | 1.8 | 1.5 | 2.72 |
| AZ8 extracelular fracción 1 | 6.8 | 3.5 (colectada por pico) | 23.86 |
| AZ8 extracelular fracción 11-13 | 2.3 | 1.5 | 3.41 |
| AZ8 extracelular fracción 14-20 | 5.4 | 3.5 | 18.93 |
| IS03 intracelular crudo | 87 | ---- | ---- |
| AZ8 intracelular crudo | 146 | ---- | ---- |
| IS03 intracelular fracción 1 | 11.9 | 3 (colectada por pico) | 35.86 |
| IS03 intracelular fracción 2 | 3.72 | 3 (colectada por pico) | 11.18 |
| IS03 intracelular fracción 13-17 | 11.2 | 2.5 | 28.18 |
| IS03 intracelular fracción 19-22 | 6.59 | 2 | 13.18 |
| AZ8 intracelular fracción 1 | 4.86 | 3 (colectada por pico) | 14.59 |
| AZ8 intracelular fracción 2 | 8.72 | 3 (colectada por pico) | 26.18 |
| AZ8 intracelular fracción 13-14 | 3.72 | 1 | 3.72 |
| AZ8 intracelular fracción 15-17 | 16.5 | 2.5 | 41.13 |
| AZ8 intracelular fracción 19-21 | 3.59 | 1.5 | 5.38 |

En el contenido de proteína extracelular se observó que la mejor fracción que contiene la mayor concentración de proteína, es la 1 para ambas cepas, y para las proteínas intracelulares encontramos a la fracción AZ8 15-17 como la de mayor contenido de proteína frente a todas las fracciones, sin exentar que para el caso de la IS03 las fracciones 1 y 13-17, también fueron altas en esta determinación. Comparando las extracelulares con las intracelulares se obtienen mejores resultados en esta última.

6.2.4. Identificación de Productos de hidrólisis por HPLC

En este punto de la investigación se optó por emplear métodos más específicos para identificar a los productos de hidrólisis, desplazando así la metodología de cuantificación de azúcares por DNS, con la que se trabajó para la muestra comercial Novozym 960, en donde sólo se determinó el porcentaje de fructosa producido, entre sus limitantes encontramos la no identificación de los productos IOS, que se generaban en las reacciones, de importancia para este trabajo de investigación, ya que el objetivo de purificar a las enzimas es el obtener IOS, por sus aplicaciones en la industria alimentaría como prebióticos, entre otros.

Para las fracciones de IS03 extracelulares, se obtuvo una tendencia en todas las muestras analizadas (fracciones 1, 11-13, 16-18 y 19-21), en las cuales se observaron señales que indicaban la presencia de fructosa y glucosa, aunque estas señales se mostraron muy bajas, razón por la cual no se mostraron los cromatogramas, también se observó la señal de agavina no consumida. A pesar de la producción baja de estos compuestos, esto no se contradice con la cromatoplaça (Figura 16), en donde se aprecia a la fructosa como único producto.

El mismo resultado obtenido para IS03 se observó con las proteínas extracelulares de la cepa AZ8 (fracciones 1, 11-13 y 14-20), solo se observó la señal de agavina alrededor de los 25 min de retención, y una señal a los 7 minutos que nos indica la presencia de fructosa y glucosa a los 5 minutos, de igual forma con baja intensidad, debido a que su producción fue muy baja, esto probablemente sea consecuencia de una baja concentración de proteína en estas fracciones, sin

embargo como se vio con anterioridad, en cromatoplasmas, si presentan actividad hidrolítica frente a la agavina (Figura 16).

En el análisis de las fracciones intracelulares obtuvimos, mejores resultados a diferencia de las fracciones extracelulares. En la Figura 24 correspondiente a la fracción ISO3 13-16, se aprecian 3 señales, una a los 6.647 min, este comparado con los tiempos de retención de los estándares se asemeja a la fructosa (7.167 min de retención), a los 9.256 min se observa otra señal lo que indica la presencia de un dímero como lo es la inulobiosa, esto podemos suponerlo, ya que en el TLC (Figura 21) se observa una banda con un r_f de 0.53, que se encuentran por debajo de la banda de fructosa. Las exo-inulinasas catalizan la remoción de unidades de fructosa desde el inicio hasta el final de la cadena con la hidrólisis del residuo de sacarosa (Rouwenhorst *et al.*, 1990), por lo que en esta fracción encontramos exo-inulinasas. Al minuto 21, se observa una señal que es una combinación de agavina con compuestos de mayor peso molecular, como son los IOS, lo que concuerda con la cromatoplasma (Figura 21), en donde se observan bandas oscuras desde el inicio de la elución con un r_f de 0.36, generadas por IOS los cuales son producidos por las endo-inulinasas, que están presentes en esta fracción.

La Figura 25 muestra los productos de hidrólisis para la fracción ISO3 intracelular 19-22. Aquí se muestran dos señales, la primera que empieza a salir al minuto 15, con un máximo al minuto 19 y la segunda marca un tiempo de 24 minutos, lo que son restos de agavina. La señal marcada con un círculo rojo es muy ancha, por lo que esta señal está compuesta por los productos de hidrólisis y en el análisis no se obtuvo una buena resolución, sin embargo, esta señal es clara de que se generaron compuestos de mayor peso molecular, por lo que en la fracción ISO3 intracelular 19-22 encontramos primordialmente a la endo-inulina.

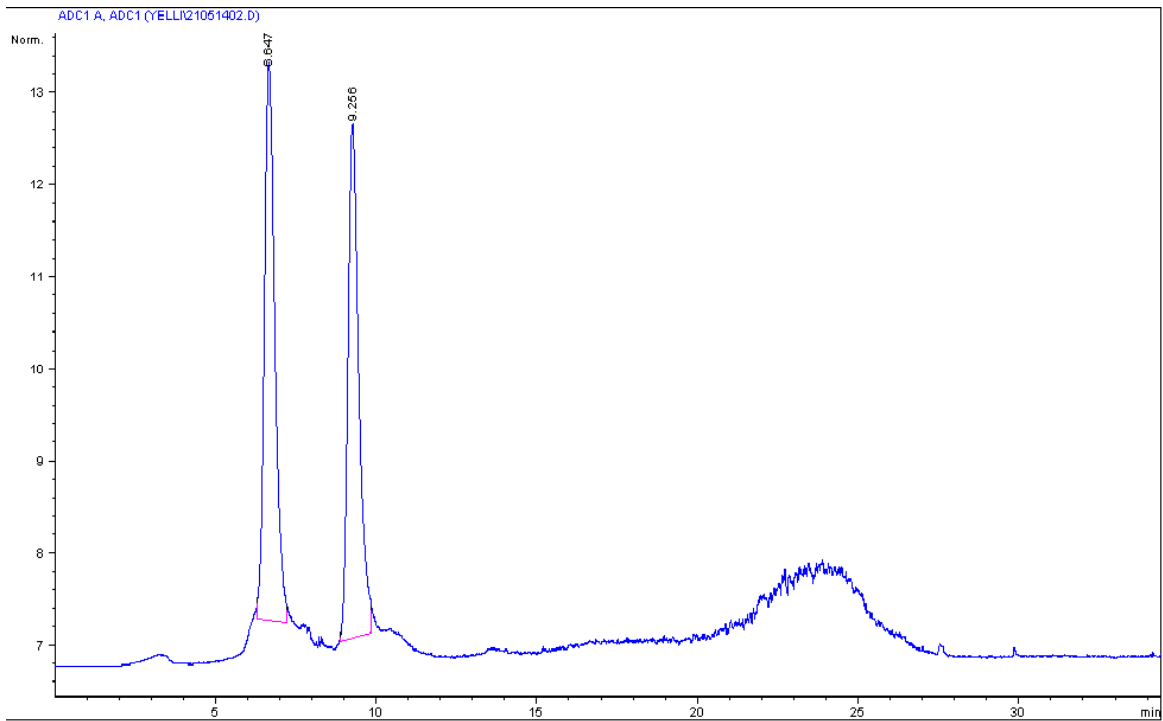


Figura 24. Cromatograma de la reacción de la fracción IS03 intracelular 13-16 en un medio con inulina de agave al 1%.

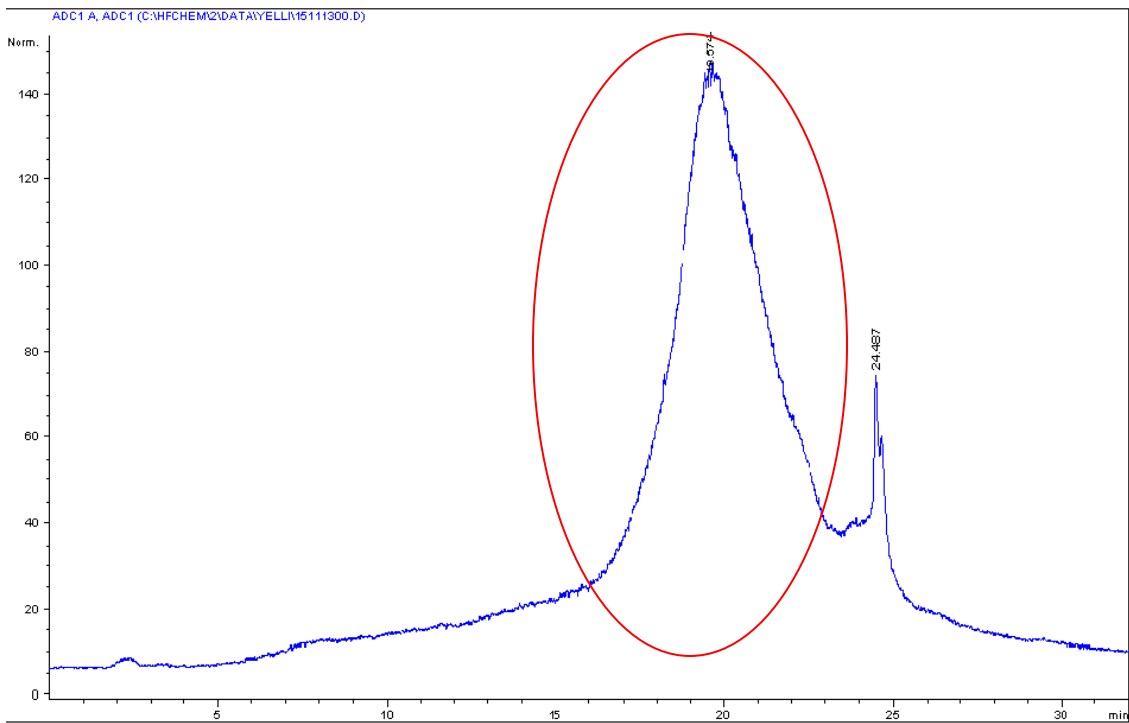


Figura 25. Cromatograma de la reacción de la fracción IS03 intracelular 19-22 en un medio con inulina de agave al 1%.

En la fracción AZ8 intracelular 15-18, se observa la producción de compuestos de alto peso molecular, con la aparición de señales a los minutos 18, 19 y 20 y una de baja intensidad al minuto 17, señalada con un círculo rojo (Figura 26). Como se observa en el cromatograma de estándares (Figura 1, anexo) los FOS empiezan a salir alrededor del minuto 13 (kestosa 13.735 min) y antes del minuto 24, tiempo al que sale la agavina, por lo que se las señales aquí mostradas indican la presencia de IOS mayores a la fructofuranosilnístosa (16.345 min de retención), aunque la señal al minuto 17 puede ser una baja producción de la antes mencionada, y las señales posteriores, indican polímeros mayores a esta que contiene 4 unidades. En reportes de Muñoz-Gutierrez, (2009) indica que el grado de polimerización para la inulina varían típicamente entre 20 y 30 unidades de fructosa, por los que los productos aquí observados pueden ir a partir de las 5 unidades hasta las 20 unidades de fructosa; concluyendo así que esta fracción intracelular para la cepa AZ8 es la que mayor contenido tiene de endo-inulinasa.

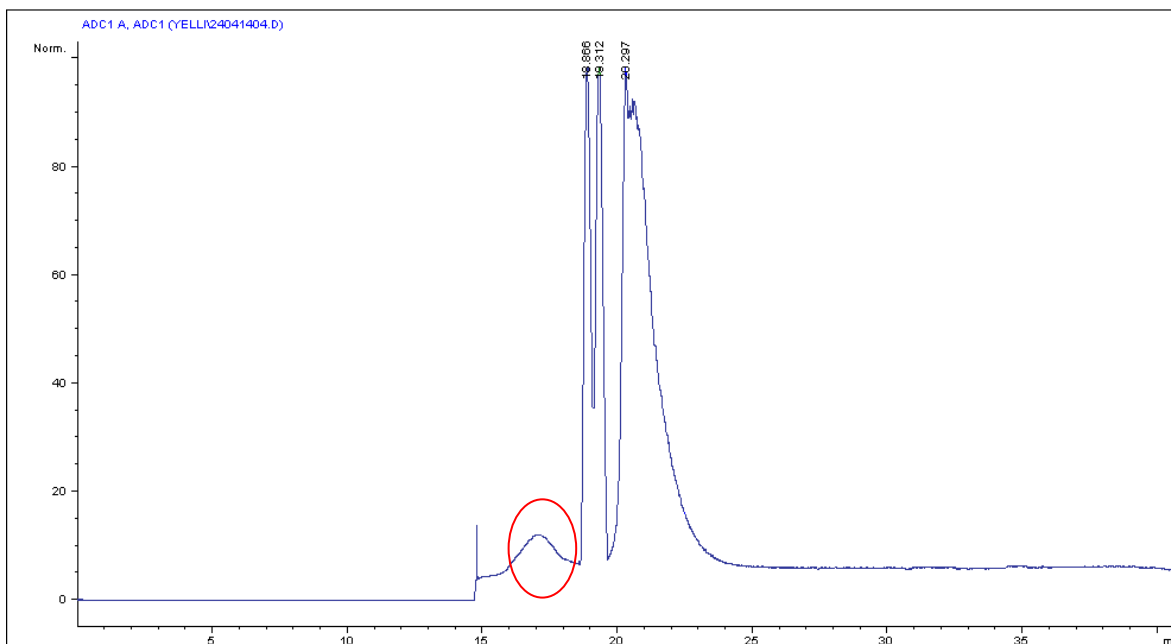


Figura 26. Cromatograma de la reacción de la fracción AZ8 intracelular 15-18 en un medio con agavina al 1%.

En las demás fracciones intracelulares para ambas cepas se obtuvieron señales por los 5 y 7 minutos, las cuales indican presencia de glucosa y fructosa como productos principales, también hubo señales entre los 9 y 10 minutos, que como es mostrado en el cromatograma de estándares (Figura 1, anexo), los FOS analizados empiezan a salir a partir del minuto 13, por lo que estas señales son indicios de dímeros, y en estas fracciones se encuentran a las mismas enzimas, que son la exo-inulinasa, generando fructosa y glucosa y a la endo-inulinasa, aunque en menor concentración.

Haciendo una comparación entre *Aspergillus niger* (nozym 960) y *Kluyveromyces marxianus*, para fines de esta investigación se encontró que ambos microorganismos producen a la exo y endo inulinasa, sin embargo, *K. marxianus* tiene más actividad de exo-inulinasa, a diferencia de *A. niger* que presenta una mayor actividad de endo-inulinasa en las fracciones 0.5 M, 0.7 M y 1M. La principal diferencia encontrada es que las enzimas producidas por el hongo no actúan frente a la agavina, como si lo hace las de *K. marxianus*.

6.2.5. Electroforesis SDS PAGE de los extractos celulares ISO3 y AZ8

En la Figura 27 se presenta el gel con las muestras de inicio, es decir ISO3 y AZ8 intracelulares; debido a la concentración de estas (Tabla 4) las proteínas extracelulares no se aprecian aquí (cargadas en los carriles 1 y 2). Se aprecia para las proteínas intracelulares, 6 bandas para ambas cepas, sin embargo 2 bandas de estas se muestran con mayor intensidad y de masa molecular cercana a la que se reporta de 57 kDa para las inulinasas de *Kluyveromces marxianus* (Brenda Database 695652), por lo que las proteínas marcadas en rojo son la exo y endo inulinasa. Para el caso de las proteínas extracelulares se observó el mismo patrón, aunque debido a la concentración, su tinción fue muy tenue, lo que nos indica que el microorganismo si expulsa las proteínas a su exterior.

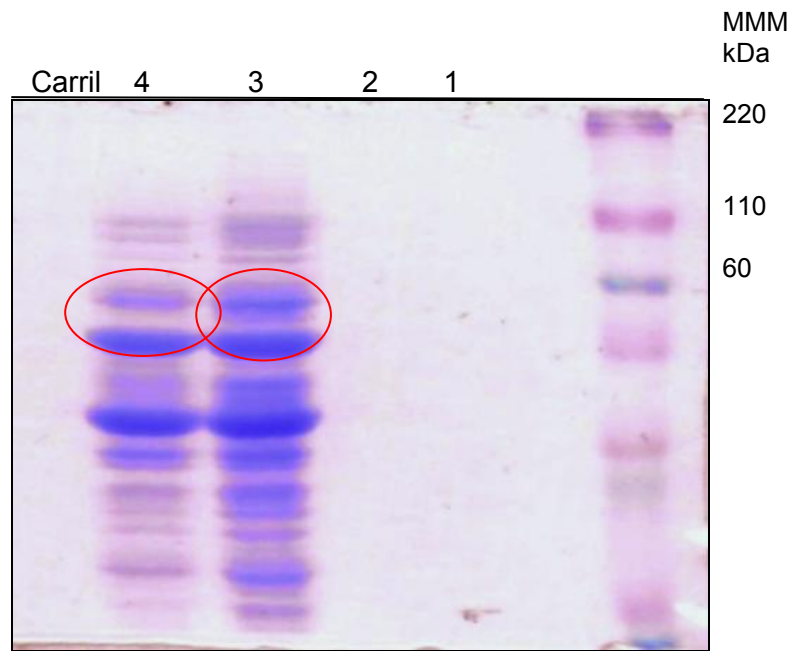


Figura 27. Gel de poliacrilamida proteína intracelular. De izquierda a derecha se observa a la cepa IS03 en el carril 4, AZ8 en el carril 3, y al final del gel los marcadores de masa molecular.

7. CONCLUSIONES

A partir de la purificación de una mezcla enzimática comercial se pudo implementar una metodología de purificación para enzimas producidas a partir del crecimiento microbiano de la levadura *Kluyveromyces marxianus* de 2 cepas diferentes IS03 y AZ8, las cuales presentaron actividad hidrolítica frente a la agvina, produciendo mayormente fructosa y glucosa, así como inuloooligosacaridos (IOS).

Se obtuvo que las mejores fracciones fueron aquellas que se unieron a la columna de intercambio aniónico para todos los casos, muestra comercial Novozym 960 y cepas *K. marxianus*. En el caso de las cepas de *K. marxianus* se obtuvieron mejores resultados con las proteínas intracelulares. La fracción AZ8 intracelular 15-17 tuvo un alto rendimiento en producción de proteínas y produjo polímeros de alto peso molecular (tales como fructofuranosilnística). La cepa IS03 también tuvo concentraciones altas de proteína para la fracciones 13-17 y 19-22, produciendo fructosa, glucosa e IOS. En ambas cepas se expreso principalmente a la exo-inulinasa, aunque también se logró la expresión de la endo-inulinasa. Con la muestra comercial Novozym 960 la mejor fracción obtenida fue 0.3M, con un contenido mayor de proteína y generando la mayor cantidad de productos de hidrólisis y la fracción 0.7M fue en donde se encontró mejor actividad de endo-inulinasa y mejor producción de IOS.

La purificación de la muestra comercial Novozym 960 se logró principalmente en las fracciones del precipitado dos en 0.3M, 0.5M y 0.7M. A diferencia de los cultivos realizados con *K. marxianus*, en donde la purificación fue parcial, ya que se obtuvieron diferentes mezclas enzimáticas, que contienen tanto exo como endo inulinasas, la diferencia en estas fracciones radicó en la concentración de las 2 enzimas y por ende en la actividad que se encontró en cada una de las diferentes fracciones de purificación.

8. PERSPECTIVAS

Evaluar otras metodologías como exclusión molecular para lograr una mayor separación de la exo y endo inulinasa proveniente de *Kluyveromyces marxianus*.

Estandarizar el medio de cultivo así como el tiempo de crecimiento, en el cual se logre un aumento de la producción de inulinasas y estas sean excretadas de la célula.

Detallar el análisis de identificación por HPLC de los productos de hidrólisis, así como el análisis de la cuantificación de dichos productos.

9. BIBLIOGRAFÍA

Bautista- Justo M, L.Garcia- Oropeza, R. Salcedo- Hernández, L. Parra- Negrete, 2001. Azúcares en Agaves (Agave tequilana Weber) cultivados en el estado de Guanajuato. *Acta Universitaria* 11:1:33-38.

Bender, J., Mazutti, M. Treichel, H., Di Luccio, M. 2006. Inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* -244 - NRRL Y - 7571 using solid state fermentation. *Appl Biochem Biotechnol*, 32:951-958.

Castillo, A., Chamy, R. 2010. Producción de inulinasa por levaduras de *Kluyveromyces marxianus*. *Scientia Agropecuaria*, 1: 235 – 245.

Catsimpoolas, 1976. *Methods of protein separation*. New York: Plenum press.

Cazetta, M., Martins, P., Monti, R., Contiero, J., 2005. Yacon (*Polymnia sanchifolia*) extract as a substrate to produce inulinase by *Kluyveromyces marxianus* var. *Bulgaricus*. *Journal of Food Engineering*, 66: 301-305.

Chacón, A., 2006. Perspectivas agroindustriales actuales de los oligofruetosacáridos (FOS). *Agronomía Mesoamericana*, 17(2): 265-286

Chen, X., Wang, J., Li, D., 2007. Optimization of solid-state medium for the production of inulinase by *Kluyveromyces* S120 using response surface methodology. *Biochem. Eng. J.* 34: 179-184.

Chi, Z.M., Chi, Z., Zhang, T., Liu, G.L., Yue, L., 2009. Inulinase expressing microorganisms and applications of inulinases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82 , 211-221.

Cherbut, C., 2002. Inulin and oligofruetose in the dietary fiber concept. *British Journal of Nutrition*.87 (2): S159-S162.

Cruz-Guerrero, A., García-Peña, I., Barzana, E., García-Garibay, M., Gómez-Ruíz, L., 1995. *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278: A wild inulinase hyperproducing strain. *J. Ferment. Bioeng*, 80 : 159-163

Cruz-Guerrero, A., Olvera, J., García-Garibay, M., GómezRuíz, L., 2006. Inulinase hyperproducing strains of *Kluyveromyces* sp. Isolated from aguamiel (Agave sap) and pulque. *World J. Microbiol Biotechnol*, 22 :115-117

Delzenne, N., Williams, C., 2002. Prebiotics and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 13: 61-67.

Farnworth, R., Suzuki, M., Chatterton, N., 1993. Fructans in human and animal diets. In: Science and technology of fructanos. eds pp 257–272, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

García Mendoza, A., 1995. *El maguey una planta maravillosa: en torno al pulque y al maguey*. CD.México: Grupo editorial Siquisiri.

González- González L. R., García, I., Pérez, R., Gutierrez, K., García, A., Investigación Universitaria Multidisciplinaria – Año 6, N° 6.

Greasham, R., Inamine, E. 1986. Nutritional Improvement of Processes. En Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, (Ed. Demain & Solomon); pp 59-65. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Gupta, A. K., Singh, D. P., Kaur, N., Singh, R.1994. Production, purification and immobilisation of inulinase from *Kluyveromyces Fragilis* . *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 54 , 377-385.

Hensing, M., Vrouwenvelder, J., Hellinga, C., Van Dijken, J., Pronk, J. 1995. Use of chemostat data for medelling extracellular inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* in a high cell density fed batch process. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 79: 54 – 58.

Kang, N. 2008. Production of inulinase using tap roots of dandelion (*Taraxacum officinale*) by *Aspergillus niger*. *J. Food Eng.* 85 , 473-478.

Kaur, N., Gupta, A., 2002. Aplications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *J.Biosci.* 27 , 703-714.

Kochhar, A., Gupta, A., Kaur, N., 1999. Purification and immobilisation of inulinase from *Aspergillus candidus* for producing fructose *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 79, 549- 554.

Kushi, R., Monti, R., Contiero, J., 2000. Production, purification and characterization of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 25: 63-69.

Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., Arrizón-Gaviño, J., Herrera-Suárez, T., García-Mendoza, A., Gschaedler-Mathis, A., 2008. Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. . *FEMS Yeast Res.*8 , 1037-1052.

Lehninger, A., Nelson, D., Cox. M., 2004. Amino acid, peptides and proteins. En:. Freeman. W. Principles of Biochemistry. New york. Hardcover. 75-110

- Liu, Y., Liu, Q., Tay, J. 2005. Initial conditions-dependent growth kinetics in microbial batch culture. *Process Biochemistry*, 40:155-160.
- López, M. G., N.A. Mancilla-Margalli, G. Mendoza- Diaz. 2003. Molecular structures of Fructans from Agave tequilana Weber var. Azul. *Journal of Agricultural and food Chemistry* 51 , 7835-7840.
- Mancilla- Margalli, A., Lopez, M., 2006. Water soluble carbohydrates and fructan structure patterns from Agave and Dasyliirion species. *J Agric Food* 51 , 7835-7840.
- Mazutti, M., Bender, J., M. Treichel, H., Di Luccio. 2006. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. *Enzyme Microb Technol*, 39:56-59.
- Mazutti, M., Zobot, G., Boni, G., Skovronski, A., de Oliveira, D., Di Luccio, M., Rodríguez, M., Treichel, H., Maugeri, F., 2010. Kinetics of inulinase production by solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor. *Food Chemistry*, 120: 163-173.
- Muñoz-Gutierrez, I.Rodríguez-Alegría, M.E., López-Munguía, A., 2009. Kinetic Behavior and specificity of β -fructosidase in the hydrolisis of plant and microbial fructans. *Process Biochemistry*.
- Nagem, R.A., Rojas, A. L., Golubev, A.M., Korneeva, O. S., Eneyskaya, E.V, Kulminskaya, A.A., Neustroev, K.N., Polikarpov, I., 2004. Crystal structure of exo-inulinase from *Aspergillus awamori*: the enzyme fold and structural determinants of substrate recognition. *J Mol Bio* 281, 471-480.
- Nakamura, T., Nagatomo, Y., Hamada, S., Nishino, Y., Ohm, K., 1994. Occurrence of two forms of extracellular endoinulinase from *Aspergillus niger* mutant 817. *J. Ferment. Bioeng.* 78 , 134-139
- Olvera C., E. Castillo, López-Munguía, A., 2007. Fructosiltransferasa, fructanas y fructosa. *Biotecnología* 14 , 327-345.
- Pandey, A., Soccol, C., Selvakumar, P., Soccol, V., Krieger, N., Fontana, J.,1999. Recent developments in microbial inulinases. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 81 , 35-52.
- Pingoud, A., 2002. *Biochemicals Methods*. Weinheim: Wiley- VCH.
- Rica. E., Calabro, V., Curcio, S., Iorio, G., 2007. The State of the art in the production of fructose from inulin enzymatic hydrolisis. *Critical Reviews in Biotechnology* 27 , 129-145.

Roberfroid, M., 2001. Prebiotics: preferential substrates for specific germs. *American Journal of Clinical Nutrition*. 65(5): 405-408.

Rouessac, F., Rouessac, A., 2003. *Análisis Químico: métodos y técnicas instrumentales modernas*. España: McGraw-Hill Interamericana de España.

Rouwenhorst, R., Hensing, M., Verbakel, J., Scheffers, W., Van Dijken, J., 1988. Production, distribution, and kinetic properties of inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl. Environ. Microbiol.*54(5):1131-1137

Schmidt, H., Sapag, M., Vergara, R., Pennacchiotti, I., Mella, M., Vinagre, J., Masson, L., Lladser, M., Díaz, L., Karmelic, J., 1979. Integrantes de los alimentos de importancia en tecnología. Santiago. Universidad de Chile Facultad de Ciencias Químicas y Farmacológicas

Silva-Santisteban, B., Filho F., 2005. Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*. *Enzyme Microb Technol*, 36:717-724.

Singh, R., Bhermi, H., 2008. Production of extracellular exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-I using root tubers of *Asparagus officinalis*. *Bioresource Technology*, 99: 7418 – 7423.

Skoog, D., Holler, J., Crouch, S., 2001. *Química analítica*. C.D México : Mac Graw Hill.

Tokunaga, T., 2004. Novel physiological function of fructooligosaccharides. *BioFactors*. 21(1/4): 89-94.

Ulloa, J., Espinosa, H., Cruz, G., Ulloa, P., Ulloa, B., Ramirez, J., 2010. Los fructanos y su papel en la promoción de la salud. *fuentes* , 57-62.

Vandamme, E., Derycke, D., 1983. Microbial inulinases: fermentation process, properties and applications. *Adv. Appl. Microbiol.* 29 , 139–176.

Vijayaraghavan, K., (2009). Trends in inulinase production: a review. *Critical reviews in biotechnology*. 29. , 67-77.

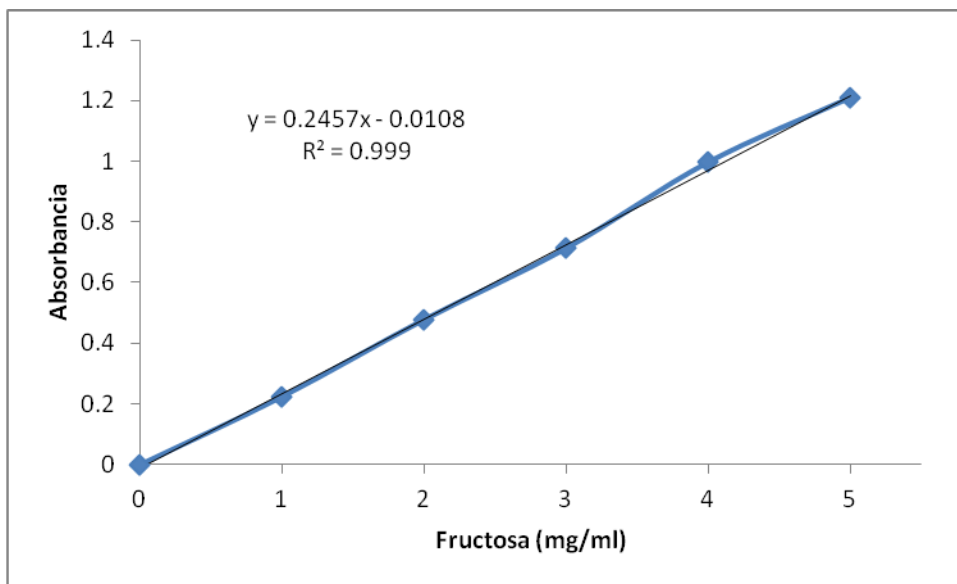
Wei, W., Zheng, Z., Liu, Y., Zhu, X., 1998. Optimizing the culture conditions for higher inulinase production by *Kluyveromyces* sp. Y-85 and scaling – up fermentation. *J. Ferment. Bioeng*, 86 (4): 395 -399.

Xiong, Ch., Jinhua, W., Dongsheng, L., 2007. Optimization of solid.state medium for the production of inulinase by *Kluyveromyces* S120 using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 34: 179 – 184.

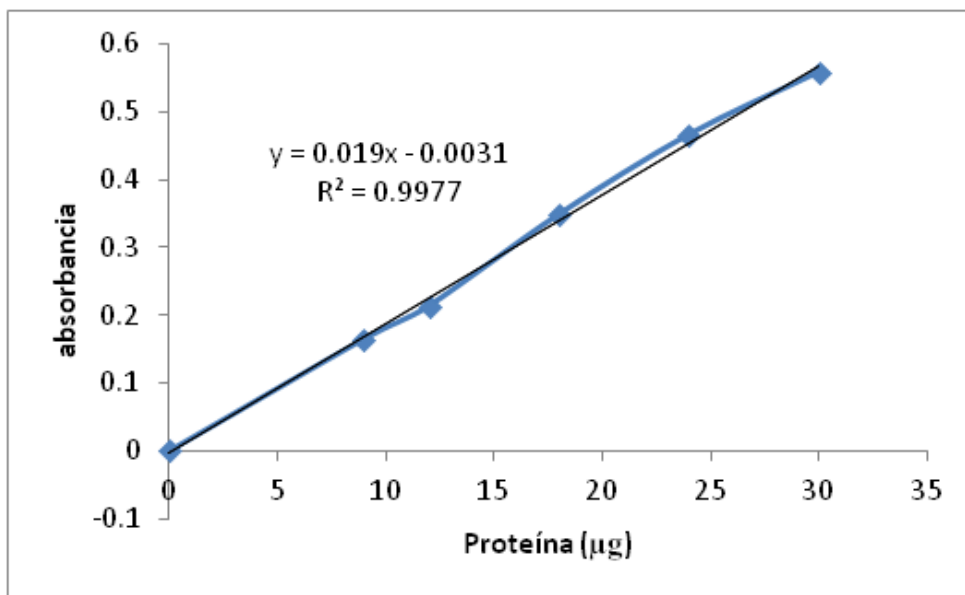
Zahida, K., Majid, M., Azhar, S., Aneela, K., 2008. Simultaneous determination of common inorganic anions in water samples by ion chromatography. *Journal of basic and applied sciences* .

10. ANEXO DE GRÁFICAS Y FIGURAS

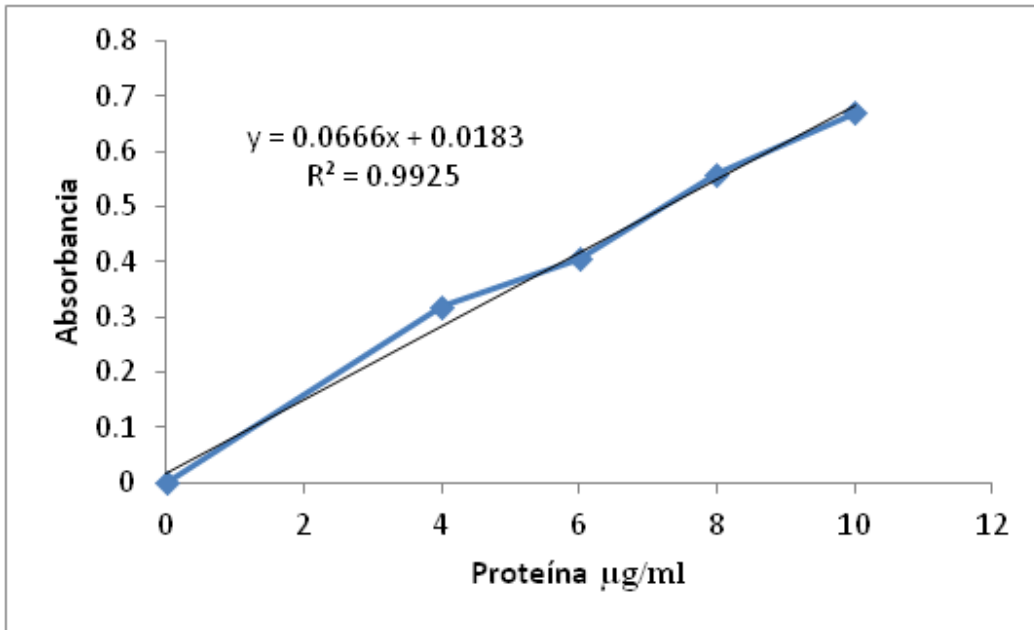
Curvas patrón para las distintas determinaciones (proteína y fructosa) y análisis de estándares por HPLC.



Gráfica 1. Curva patrón de fructosa por el método DNS, para el cálculo de fructosa contenida en las diferentes fracciones de Novozym 960.



Gráfica 2. Curva patrón proteica determinada por el método de Bradford, para el cálculo de proteína contenida en las diferentes fracciones de Novozym 960.



Gráfica 3. Curva patrón proteica determinada por el método de Bradford, para el cálculo de proteína contenida en las diferentes fracciones de las cepas IS03 y AZ8.

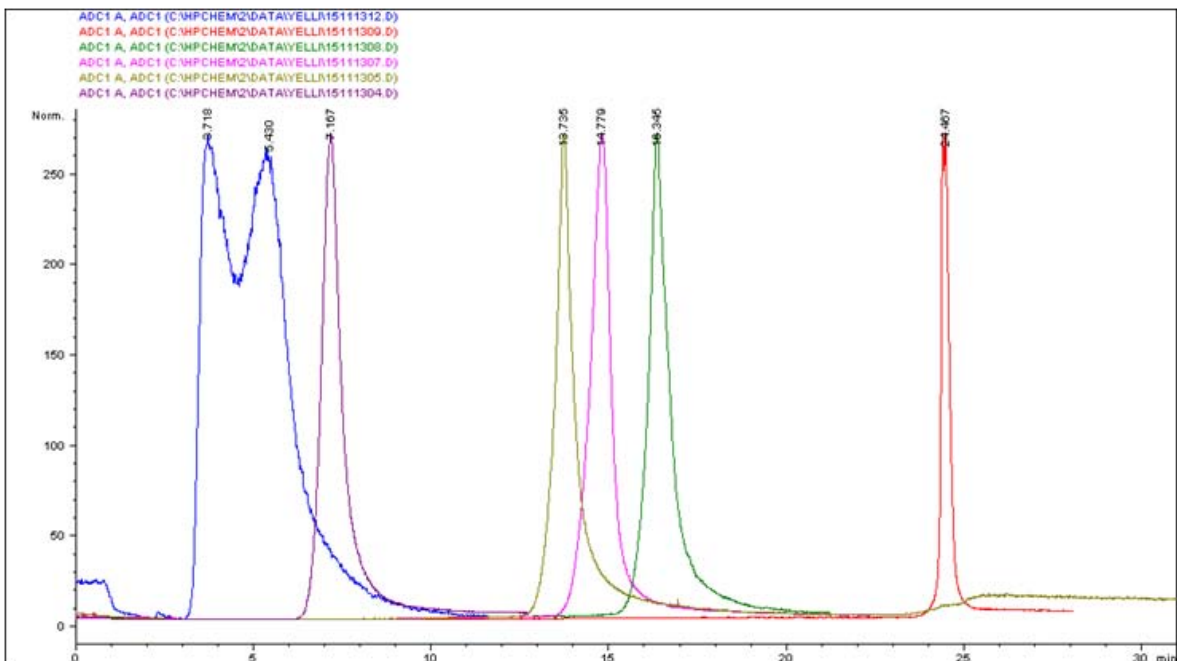


Figura 1. Cromatograma de estándares de azúcares analizados por HPLC. Glucosa 3.718 min, 5.430 min, fructosa 7.167min, kestosa 13.735min, nistosa 14.779min, fructofuranosilnistosa 16.345min, agavina 24.467 min.

11. ANEXO DE METODOLOGÍAS

Electroforesis SDS- PAGE

Para la realización de la electroforesis se prepararon las siguientes soluciones:

- Solución stock monomérica 30% acrilamida 0.8% bis acrilamida
- Buffer de resolución; Tris 1.5M, ajustando pH a 8.8 con HCl
- Stacking gel buffer; Tris 0.5M, ajustando pH a 6.8 con HCl
- Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%
- Iniciador (NH₄)₂S₂O₈ (persulfato de sodio) al 10%
- Buffer de carga, que se preparo agregando 2.5ml de stacking gel buffer, 4ml de SDS 10%, 2ml de glicerol, 1 ml de 2-mercaptoetanol, 20µl de una solución de azul de bromofenol al 20%.
- Buffer de corrida Tank; Tris 0.025M, ajustando pH a 8.3 con HCl, 0.192M de glicerina, 0.1% SDS.
- Solución teñidora con 250mg de azul Comassie, 400ml de metanol, 70ml ácido acético glacial posteriormente aforar a 1L.
- Solución desteñidora 45% metanol, 10% ácido acético.

Se elabora el gel montando los vidrios en el soporte de pinzas, aproximadamente se llenan las placas con 5cm de la mezcla del gel de separación con 3.3 ml de stock, 2.5 ml de buffer de resolución, 0.1 ml de solución de SDS al 10% 4 ml de agua, 100 µl de persulfato de amonio y 13 µl de tetrametiletilenodiamina (TEMED); para evitar burbujas en el borde del gel, así como emparejar el nivel del gel, se adiciona agua hasta el tope, pasados alrededor de 5 minutos, tiempo necesario para que la solución gelifique, se vierte el gel de apilamiento con 0.7ml de stock, 1.25ml de stacking buffer, 50 µl de solución SDS al 10%, 3 ml de agua, 100 µl de persulfato de amonio y 13 µl de TEMED y se coloca el peine para formar los pozos contenedores de las muestras, se deja gelificar aproximadamente 5 minutos.

Una vez listo los geles se colocan en el tanque, el cual se llena con buffer de corrida, se retira el peine formador de pozos y se colocan los marcadores de peso

molecular y las muestras previamente preparadas colocando 20 μ l de enzima 5 μ l de buffer de carga, se sometieron a tratamiento térmico a 90°C por 5 minutos. Se conecta a la fuente de poder, se deja correr las muestras a 75 volt en el gel de apilamiento y a 100 volt una vez que estas entran al gel de separación, aproximadamente 1 hora y media; una vez que el colorante del buffer de carga llegue casi al final del gel, se apaga y se saca el gel para su tinción, sumergiéndolo en la solución teñidora, por varias horas para un mejor teñido, cuando se haya logrado la tinción de las enzimas y los marcadores de peso las bandas, finalmente para obtener un mejor revelado, se destiñe el contorno de las bandas utilizando una solución desteñidora.